

Dopa-responsive Dystonie:

Molekulargenetische Untersuchungen am Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase I- und
TorsinA-Gen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Diana Gabriela Fischer

aus Siegen

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie,
Klinische Immunologie und Humangenetik

Institut für Humangenetik

Leiter: Prof. Dr. U. Müller
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. U. Müller

Gutachter: PD Dr. P. Oschmann

Tag der Disputation: 29.08.2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Dystonie	1
1.2	Dystonie 5: Dopa-responsive Dystonie (DRD), Segawa-Syndrom	2
1.2.1	Allgemeines	2
1.2.2	Klinische Symptomatik, Phänotyp der DRD	3
1.2.3	Pathophysiologie und Genetik der DRD	5
1.2.4	Funktion der GTP Cyclohydrolase I (GTPCH I) bei der Dopaminsynthese	7
1.3	Dystonie 1: idiopathische Torsionsdystonie als eine mögliche Differentialdiagnose der Dopa-responsiven Dystonie	8
1.4	Zielsetzung	10
2	Materialien	11
2.1	Geräte und Zubehör	11
2.2	Chemikalien	12
2.3	Enzyme und Nukleotide	14
2.4	Radionukleotide	15
2.5	Lösungen	15
3	Methoden	19
3.1	DNA-Extraktion aus Vollblut	19
3.1.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	20
3.1.2	Fällung von DNA	20
3.1.3	DNA-Extraktion mit Hilfe des BACC2-Kits	21
3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und Oligonukleotiden	21
3.3	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
3.3.1	Konstruktion der Primer	23
3.3.2	Primer fällen	24
3.3.3	Amplifikation spezifischer Sequenzen durch PCR	24
3.3.4	Verschachtelte PCR („nested“ PCR)	27
3.3.5	Radioaktiv markierte PCR (Heiß-PCR)	28

3.4	Klonierung eines PCR-Produktes	28
3.4.1	Vorbereitung des Vektors	29
3.4.1.1	Retransformation des Vektors und Plasmid-Midipräparation	29
3.4.1.2	Vektor zur Ligation vorbereiten	31
3.4.2	Ligation	31
3.4.2.1	Klenow-Verdau des PCR-Produktes	31
3.4.2.2	Phosphorylierung des PCR-Produktes	32
3.4.2.3	Ligationsansatz	32
3.4.3	Transformation und Kultur	33
3.4.3.1	Präparation von kompetenten E. coli Zellen	33
3.4.3.2	Durchführung der Transformation	33
3.4.3.3	Blau-Weiß-Selektion	34
3.4.4	Minipräparation von Plasmid-DNA	34
3.4.5	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA	35
3.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	36
3.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.5.1.1	DNA-Aufbereitung aus Agarose-Gelen	38
3.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
3.5.2.1	Autoradiographie	41
3.6	Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	42
3.7	DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode (Sanger)	43
3.7.1	Cycle Sequencing	44
3.7.2	Direkte Sequenzierung (T7-Sequenzierung)	45
3.8	Short-Tandem-Repeats	47
4	Patienten	49
4.1	Klinische Untersuchung durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. Müller und Frau Dr. D. Steinberger	49
4.1.1	FAMILIE 1	51
4.1.2	FAMILIE 2	51
4.1.3	FAMILIE 3	53
4.1.4	FAMILIE 4	54
4.1.5	FAMILIE 5	55
4.1.6	FAMILIE 6	57

4.1.7	FAMILIE 7	58
4.1.8	FAMILIE 8	59
4.1.9	FAMILIE 9	
4.2	Krankenberichte von institutsfremden Ärzten	60
4.2.1	FAMILIE 10	60
4.2.2	FAMILIE 11	61
4.2.3	FAMILIE 12	61
4.2.4	FAMILIE 13	62
4.2.5	FAMILIE 14	63
4.2.6	FAMILIE 15	64
4.2.7	FAMILIE 16	64
4.2.8	FAMILIE 17	65
4.2.9	FAMILIE 18	66
4.2.10	FAMILIE 19	66
4.2.11	FAMILIE 20	66
4.2.12	FAMILIE 21	67
4.2.13	FAMILIE 22	68
4.3	Weitere molekulargenetisch untersuchte Personen	68
4.2.14	FAMILIE 23	68
4.2.15	FAMILIE 24	69
5	Ergebnisse	71
5.1	Molekulargenetische Untersuchungen am GTP-Cyclohydrolase I-Gen	71
5.1.1	Mutationen im Bereich von GCH 1.4 A und B	73
5.1.2	Mutationen im Bereich von GCH 1.6 A und B	75
5.1.3	Mutationen im Bereich von GCH 4.2 A und B	77
5.1.4	Mutationen im Bereich von GCH 5.1 A und B	79
5.1.5	Familien ohne Mutation im GTP-Cyclohydrolase I-Gen	87
5.2	Untersuchungen der Vaterschaft mittels polymorphen Mikrosatelliten-Markern (Short Tandem Repeat Polymorphism (STRP) Analyses)	87
5.3	Molekulargenetische Untersuchungen am Gen der idiopathischen Torsionsdystonie	89

6	Diskussion	91
6.1	Mutationen im GTP-Cyclohydrolase I-Gen (<i>GCHI</i>)	91
6.2	GTP-Cyclohydrolase I-Mangel	95
6.3	Weitere Störungen des Tetrahydrobiopterin-Stoffwechsels	97
6.4	Penetranz und deren geschlechtsspezifischen Unterschiede	98
6.5	Familien ohne Mutation im GTP-Cyclohydrolase I-Gen	100
6.6	Mutationen im TorsinA-Gen	102
6.7	Mutationen im Tyrosinhydroxylase-Gen	103
6.8	Mutationen im Parkin-Gen: das juvenile Parkinson-Syndrom als mögliche Differentialdiagnose	104
6.9	Weitere diagnostische Möglichkeiten bei Verdacht auf Dopa-responsive Dystonie	105
6.10	Ausblick und Schlußfolgerung	108
7	Anhang	109
7.1	GTP-Cyclohydrolase 1-Gen	109
7.1.1	Exon 1 mit angrenzendem Intron und Promotor-Region	109
7.1.2	Exon 2 und angrenzende Intronbereiche	110
7.1.3	Exon 3 und angrenzende Intronbereiche	110
7.1.4	Exon 4 und angrenzende Intronbereiche	110
7.1.5	Exon 5 und angrenzende Intronbereiche	110
7.1.6	Exon 6 und angrenzendes Intron 5 sowie angrenzende 3'-Region	111
7.1.7	GCH1 translatierte Exone 1 - 6	112
7.2	Tabellen	112
7.3	Abkürzungen	115
8	Zusammenfassung	117
9	Literaturverzeichnis	119
10	Lebenslauf	129
11	Danksagung	131

1 Einleitung

1.1 Dystonie

Als Dystonie bezeichnet man Bewegungsstörungen, die durch unwillkürliche, langsame, anhaltende Muskelkontraktionen charakterisiert sind, welche zu drehenden, repetitiven Bewegungen sowie abnormen Haltungen führen [1, 8, 94]. Häufig beobachtete Symptome sind Fehlstellungen der Füße, ein bizarrer Gang, Blepharospasmus mit intermittierendem oder anhaltendem Schließen beider Augen, Schiefhals (Torticollis spasticus), oromandibuläre Dystonie mit tonischen Hyperkinesien von Kiefer, Zunge und mimischer Muskulatur sowie spasmodische Dysphonie, bei der es zu wie erstickt klingendem Sprechen mit Unterbrechungen (spastische Form) oder Versiegen der Phonation (flüsternde Form) kommen kann. Neben diesen meist spontan auftretenden Symptomen gibt es aktionsinduzierte Dystonien, die nur durch bestimmte Bewegungen und Tätigkeiten ausgelöst werden, wie zum Beispiel als Schreibkrampf, als dystone Verkrampfungen beim Geige- und Klavierspielen oder bei bestimmten Sportarten (Beschäftigungsdystonie) [5, 94]. Folge der tonischen Muskelkontraktionen können auch bleibende Haltungsschäden wie Skoliose, Lordose, Kyphose und Beckenschiefstand sein [24].

Man unterscheidet primäre von sekundären Formen, wobei die primäre Dystonie sporadisch oder familiär gehäuft als autosomal-dominante, autosomal-rezessive und X-chromosomal-rezessive Form (Tabelle 1-1) auftreten kann und die dystone Bewegungsstörung als wesentliches Symptom aufweist. Im Gegensatz dazu versteht man unter sekundärer Dystonie dystonische Symptome innerhalb anderer neurologischer Erkrankungen und Stoffwechselstörungen wie zum Beispiel M. Wilson, Mitochondriopathien, Hypothyreose oder zerebraler Insult mit Dystonie als eines von mehreren Symptomen.

Weitere Einteilung der Dystonien kann einerseits erfolgen nach Kriterien wie dem Alter beim erstmaligen Auftreten, dem topischen Verteilungsmuster der Bewegungsstörung (fokal, segmental, multifokal, generalisiert), dem Vorhandensein von tageszeitlichen Schwankungen und der Sensitivität auf L-Dopa. Andererseits gewinnt die Einteilung nach genetischen Kriterien zunehmend an Bedeutung, da inzwischen mindestens neun der zwölf unterschiedenen Dystonien (siehe Tabelle 1-1) molekulargenetisch differenziert werden können [70]. In drei Fällen konnten sogar die Gendefekte beschrieben werden, was zur Aufklärung des ungeklärten Pathomechanismus dieser Dystonien beiträgt.

Tabelle 1-1 Klassifikation primärer Dystonien (AD autosomal-dominant, AR autosomal-rezessiv, XR X-chromosomal rezessiv), modifiziert nach [70]

Bezeichnung	Vererbungsmodus	Locus	Chromosomale Lokation	betroffenes Gen
Dystonie 1; idiopathische Torsionsdystonie (ITD); <i>AD, early-onset dystonia</i>	AD	DYT1	9q34	ATP-bindendes Protein
Dystonie 2; autosomal-rezessive Dystonie, DYT2 Dystonie	AR	DYT2	--	--
Dystonie 3; X-chromosomales Dystonie-Parkinson-Syndrom (XDP)	XR	DYT3	Xq13.1	--
Dystonie 4; Torsionsdystonie 4	AD	DYT4	--	--
Dystonie 5; Dopa-responsive Dystonie (DRD); hereditäre progressive Dystonie mit ausgeprägten Tagesfluktuationen; Segawa-Syndrom	AD	DYT5	14q22.1-q22.2	GTP-Cyclohydrolase 1 Tyrosinhydroxylase
	AR	--	11p15.5	
Dystonie 6; <i>adult-onset</i> ITD des gemischten Typs	AD	DYT6	8p21-p22	--
Dystonie 7; idiopathische fokale Dystonie; <i>focal, adult-onset ITD</i>	AD	DYT7	18p	--
Dystonie 8, 9; paroxysmale dystone Choreoathetose; familiäre Dyskinesie; Mount-Reback-Syndrom	AD	PNKC CSE	2q25-q33	--
			1p21-p13.3	--
Dystonie 10; paroxysmale Dystonie; kinesigene Choreoathetose	AD	--	--	--
Dystonie 11; myoklonische Dystonie; Alkohol-responsive Dystonie	AD	--	--	--
Dystonie 12; <i>rapid-onset</i> Dystonie Parkinson	AD	DYT12	19q13	--

1.2 Dystonie 5: Dopa-responsive Dystonie (DRD), Segawa-Syndrom

1.2.1 Allgemeines

Nachdem Levodopa in der Parkinson-Therapie eingeführt wurde, erschienen um 1970 aus mindestens drei Kontinenten die ersten Berichte über den erfolgreichen Einsatz von Levodopa bei der idiopathischen Dystonie [105]. Im Jahre 1976 bereits schlugen Segawa et al. [106] aufgrund von Langzeituntersuchungen an Dopa-responsiven Dystonieklienten vor, diese „hereditäre progressive Dystonie mit ausgeprägten tageszeitlichen Schwankungen“ (HPD) von anderen Formen der idiopathischen Dystonie und dem M. Parkinson abzugrenzen. Segawa war der erste, der anhand von neun Patienten die charakteristische klinische Symptomatik dieser distinkten Bewegungsstörung zusammenfaßte, so daß diese Erkrankung heute auch als Segawa-Syndrom bekannt ist. Zunächst wurde angenommen, daß das Segawa-Syndrom nur in Japan existiere, und es dauerte ungefähr weitere 15 Jahre bis das Segawa-Syndrom als Erkrankung mit universellem Vorkommen erkannt wurde [89].

In den westlichen Ländern führten Nygaard et al. [82] 1988 den Begriff Dopa-responsive Dystonie (DRD) für alle auf Levodopa reagierenden Dystonien unterschiedlichster Ätiologie ein. Nach nochmaliger Beurteilung bereits beschriebener Fälle glichen die klinischen Kriterien der DRD denen der HPD mit ausgeprägten tageszeitlichen Schwankungen so sehr, daß man sie bald als Synonyme für ein und dieselbe Erkrankung ansah, wenn die Diagnose der DRD innerhalb strikter Kriterien gestellt wurde [48, 84].

1.2.2 Klinische Symptomatik, Phänotyp der Dopa-responsiven Dystonie

Die Dopa-responsive Dystonie ist charakterisiert durch Dystonie, gleichzeitigen oder später auftretenden Parkinsonismus, extreme Verbesserung der Symptomatik durch geringe Gaben von L-Dopa bei den meisten Patienten und zirkadiane Schwankungen der Symptomausprägung bei etwa 75 % der Indexpatienten [82, 83].

Obwohl die Erkrankung meist in der ersten Lebensdekade eintritt, gibt es auch Fälle mit Beginn der Erkrankung im Jugend- und Erwachsenenalter [70, 112]. Erste Symptome sind häufig dystone Fußhaltungen (Supinationsstellung; Pes equinovarus) oder Gangstörungen, die sich innerhalb einiger Jahre auf andere Körperregionen ausbreiten und in schweren Fällen zu völliger Bewegungsunfähigkeit führen können [111], so daß die Patienten an den Rollstuhl gefesselt sind [82]. Gleichzeitig oder später, im Erwachsenenalter aber auch isoliert, können eines oder mehrere der Parkinsonsymptome Rigor, Bradykinesie und Tremor sowie Verlust der Haltungsreflexe auftreten [39, 111]. Die Erkrankung verläuft häufig progredient, der Schweregrad des Leidens variiert jedoch zwischen den Patienten erheblich. Während sich bei manchen Individuen nur durch gezieltes Suchen leichte Symptome wie eine geringe Supinationsstellung der Füße beim Gehen feststellen lassen, gibt es Patienten, die auf den Rollstuhl angewiesen sind.

Durch Gabe von L-Dopa tritt jedoch selbst bei fortgeschrittenen, schweren Fällen häufig bereits nach Tagen bis Wochen deutliche klinische Besserung ein bis hin zur vollkommenen Remission der Symptomatik. Im Gegensatz zur Therapie des M. Parkinson ist die L-Dopa-Gabe bei DRD bei einer geringen bereits therapeutischen Dosis von etwa 1-3 mg/kg KG zusammen mit einem Decarboxylase-Hemmstoff nebenwirkungsarm und zeigt nach Nygaard et al. keinen Gewöhnungseffekt [83].

Als typisches Zeichen finden sich bei etwa 75 % der Erkrankten deutliche zirkadiane Schwankungen der Symptomausprägung, mit verminderter Symptomatik in den Morgen-

stunden oder nach längeren Schlafphasen und zunehmender Symptomatik im Laufe des Tages oder nach körperlicher Anstrengung. So beschrieben Patel et al. 1995 [93] zum Beispiel zwei Kinder, die morgens ohne Probleme zur Schule gingen und nachmittags auf dem Weg nach Hause körperliche Unterstützung brauchten. Nicht selten führen diese tageszeitlichen Schwankungen zur Diagnosestellung [26, 93].

Weitere Symptome der Dopa-responsiven Dystonie sind in Tabelle 1-2 zusammengefaßt. Das breite Symptomenspektrum sowie das variable Alter bei Krankheitsbeginn erklären, weshalb diese Bewegungsstörung häufig nicht erkannt und fehldiagnostiziert wird. So kann zum Beispiel der häufig auftretende Spitzfuß [70] oder eine Kyphoskoliose [69] fälschlich als rein orthopädisches Problem angesehen und nicht selten operativ behandelt werden. Auch die langjährige Behandlung als infantile Zerebralparese [12, 17, 27, 87] oder spastische Paraparese [26, 93] kommen vor. Ferner verleitet die zirkadiane Variation der Symptome zum Trugschluß, daß es sich um ein psychiatrisches oder psychologisches Problem wie eine Hysterie handele [93]. Die isolierte Parkinsonsymptomatik bei zuvor gesunden erwachsenen DRD-Patienten kann auch zur Fehldiagnose des M. Parkinson führen [39].

Tabelle 1-2 Symptome bei DRD-Patienten

Objektive Befunde	Blepharospasmus oromandibuläre Dystonie Schiefhals (Torticollis) Außenrotation der Arme Dystonie einzelner Finger Schreibkrampf Tremor (Hände) abnorme Haltung der Schultern stammbetonte Dystonie Skoliose, Hyperlordose Beinlängenverkürzung Supinationsstellung der Füße oder Spitzfuß spontane Dorsalextension oder Plantarflexion von Zehen fixierte Hyperflexion von Zehen (Hammerzehen) abnormer Gang oder Gehunfähigkeit spontane Unfähigkeit, Bewegungen zu Ende zu führen Parkinsonismus tageszeitliche Schwankungen
Subjektive Beschwerden	prätibialer Schmerz zitternde Oberschenkel Muskelverspannung und -krämpfe schnelle Ermüdbarkeit

Die Diagnose der Dopa-responsiven Dystonie wird in der Regel anhand der klinischen Symptomatik, der genauen Anamnese und des therapeutischen Effekts von Levodopa gestellt, unter weitestmöglichem Ausschluß von sekundären Dystonieformen mittels cranialer Computertomographie oder Kernspintomographie und Untersuchung des Kupfer- und Schilddrüsenstoffwechsels. Dabei ist die Abgrenzung zum prognostisch wesentlich ungünstigeren juvenilen idiopathischen Parkinsonismus (juveniler IP) besonders schwierig, da viele gemeinsame Symptome existieren, insbesondere Parkinsonismus, Dystonie und der therapeutische Effekt von L-Dopa [17].

Die oft schwierige Diagnosestellung der DRD führte zu dem wissenschaftlichen Interesse, biochemische und strukturelle Pathologika der Erkrankung beschreiben zu können, so daß die Erkrankung inzwischen zumindest bei einem Teil der Patienten auf molekulargenetischer Ebene geklärt werden konnte [89].

1.2.3 Pathophysiologie und Genetik der Dopa-responsiven Dystonie

Die Dopa-responsive Dystonie ist in der Regel eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit unvollständiger Penetranz. Im allgemeinen wird von einer ca. 30 %igen Penetranz ausgegangen [86]), die auf 40 % bis zu 100 % ansteigen kann, wenn diskrete Symptome berücksichtigt werden [113]. Mit einer geschätzten Prävalenz von 0,5 bis 1×10^{-6} [88] ist die DRD selten, wobei Frauen zwei- bis viermal häufiger betroffen sind als Männer [3, 82, 88].

Aufgrund der klinischen Symptomatik der Erkrankung und der guten Therapieerfolge von Levodopa wird schon seit langem eine Veränderung striatonigraler, dopaminerger Stoffwechselprozesse vermutet. Den ersten Hinweis in diese Richtung lieferten Williams et al. bereits 1979 durch die Entdeckung reduzierter Tetrahydrobiopterin-Spiegel im Liquor cerebrospinalis bei hereditärer Dystonie [130]. Tetrahydrobiopterin ist ein Coenzym der Dopaminsynthese. Außerdem sind bei DRD-Patienten auch Homovanillinsäure, das Abbauprodukt von Dopa und Dopamin, sowie Neopterin, ein Tetrahydrobiopterin-Metabolit, im Liquor vermindert [26], was die Annahme einer funktionellen Störung der striatonigralen, dopaminerger Neurone bekräftigt. Unterstützt wird diese Theorie auch durch histochemische Untersuchungen am Striatum einer verstorbenen DRD-Patientin, die reduzierte Tyrosinhydroxylase-Aktivität in den nigrostriatalen Nervenendigungen aufwies [95]).

Untersuchungen mittels Positronenemissionstomographie (PET) zeigten eine normale [109] oder allenfalls leicht verminderte [104, 124] Aufnahme von 6-[¹⁸F] Fluoro-L-dopa (FD). FD-PET beurteilt die striatonigralen dopaminergen Neurone, die diesen Befunden nach intakt sind, so daß der Defekt proximal der Dopa-Decarboxylierung liegen muß [117].

In Kopplungsanalysen wurde das Gen für die Tyrosinhydroxylase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Dopamin-Synthese, als Kandidatengen für DRD zunächst ausgeschlossen [29, 123]. Bei der genomweiten Kopplungs-Suche lokalisierten Nygaard et al. 1993 die wahrscheinliche Stelle des mutierten Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 14 zwischen *14q11-14q24.3* und bezeichneten sie mit *DYT5* [88]. In weiteren Untersuchungen an japanischen Patienten fand sich derselbe Genlocus für HPD, so daß schließlich HPD und DRD als eine einzige Erkrankung mit fehlerhaftem Gen auf Chromosom *14q* angesehen wurden [23]. Mit dem Wissen, daß das Gen für die GTP-Cyclohydrolase I (*GCHI*) in dieser Region liegt, testeten Ichinose et al. 1994 *GCHI* als Kandidatengen für HPD/DRD. Dabei fanden sie Mutationen bei betroffenen Familienmitgliedern in vier von fünf untersuchten Familien [48] und bestätigten damit mutiertes *GCHI* als eine Ursache für HPD/DRD.

GCHI codiert für das Enzym GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I), ist auf Chromosom *14q22.1-q22.2* lokalisiert [48] und liegt so innerhalb der von Nygaard et al. [88] beschriebenen „kritischen Region“ von *DYT5*. *GCHI* besteht aus sechs Exonen (Abb. 1-1) und umfaßt ~30 Kilobasen (kb) [49]. Die für Aminosäuren codierende Sequenz besteht aus 750 Nukleotiden (cDNA und Aminosäuresequenz siehe Anhang).

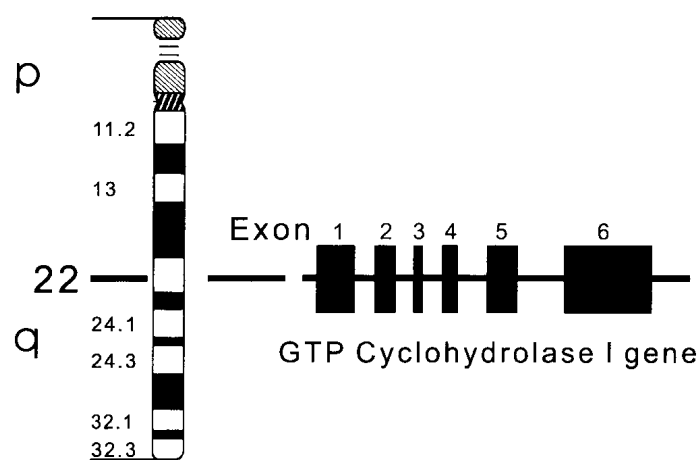


Abb. 1-1 Genlocus und Struktur von *GCHI*

Von Lüdecke et al. [64] wurden 1995 erstmals eine Mutation im Tyrosinhydroxylase-Gen (*TH*) auf Chromosom *11p15.5* mit reduzierter Tyrosinhydroxylase-Aktivität [58] bei zwei Geschwistern mit Segawa-Syndrom beschrieben. Inzwischen wurden mehrere rezessive Mutationen in *TH* entdeckt, wobei im Phänotyp eine milde Form des Tyrosinhydroxylase-Mangels mit den Symptomen einer DRD und eine schwere Form mit infantilem Parkinsonismus unterschieden werden müssen [13].

1.2.4 Funktion der GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) bei der Dopaminsynthese

(6R)-(L-*erythro*-1',2'Dihydroxypropyl)-2-amino-4-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydrobiopteridin (Tetrahydrobiopterin, BH₄) ist ein essentieller Cofaktor der drei Aminosäure-Monooxygenasen Tryptophan-, Phenylalanin-, und Tyrosinhydroxylase. Die Tryptophanhydroxylase ist notwendig für die Serotoninsynthese, die Phenylalaninhydroxylase katalysiert die Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin, und die Tyrosinhydroxylase ist essentiell für die Reaktion von Tyrosin zu L-Dopa und ist damit Voraussetzung für die Produktion von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin.

BH₄ wird in mehreren enzymatischen Reaktionen aus GTP synthetisiert. Die Umwandlung von GTP in D-*erythro*-7,8-Dihydroneopterintriphosphat (NH₂TP) ist der erste Schritt der BH₄-Biosynthese und wird durch die GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) katalysiert (siehe Abb. 1-2). Diese Reaktion wird als die geschwindigkeitsbestimmende des BH₄-Syntheseweges angesehen [76].

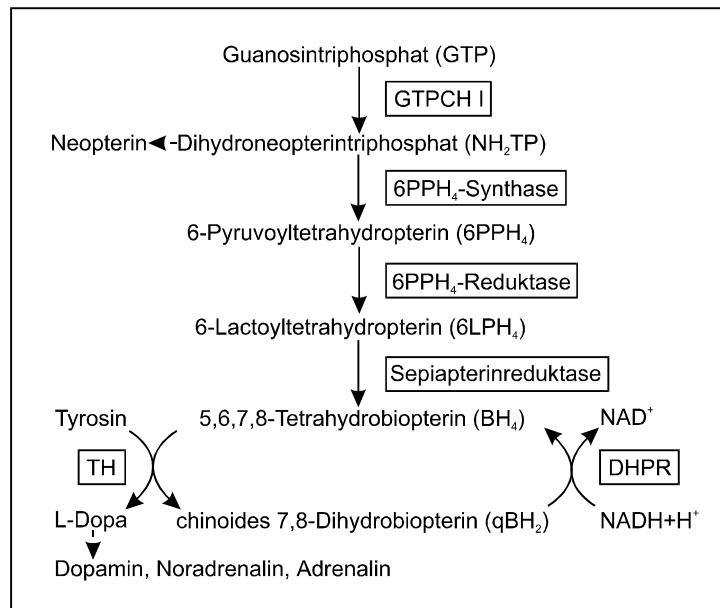


Abb. 1-2 Pteridin Syntheseweg. Rolle der GTP-Cyclohydro-lase I (GTPCH I) bei der Synthese von L-Dopa und damit Dopamin. (TH = Tyrosinhydroxylase, DHPR = Dihydropterin-reduktase)

1.3 Dystonie 1: idiopathische Torsionsdystonie als eine mögliche Differentialdiagnose der Dopa-responsiven Dystonie

Die idiopathische Torsionsdystonie (ITD) ist wie die Dopa-responsive Dystonie (DRD) eine autosomal dominant vererbte Bewegungsstörung, üblicherweise mit Krankheitsbeginn im Kindesalter (*early-onset* Dystonie) und niedriger Penetranz von 30-40 %. Interfamiliäre Schwankungen der Penetranz sind jedoch bekannt. So wurde in einer großen amerikanischen Familie eine Penetranz von ca. 70 % gefunden [86].

Die Symptome beginnen v. a. in der unteren Extremität, zunächst in einem Bein. Sie breiten sich aber regelmäßig innerhalb von fünf Jahren auf andere Extremitäten aus. Die dystonen Symptome entsprechen weitgehend denen der DRD. Anscheinend gibt es eine Korrelation zwischen der Lokalisation der ersten Symptome und dem klinischen Verlauf. So ist die Prognose schlecht und Generalisation am wahrscheinlichsten, wenn die Symptome in den Beinen beginnen [67]).

Bei häufigstem Beginn der Erkrankung im Kindesalter variiert das Alter bei Krankheits-eintritt zwischen 4 und 80 Jahren [25], wobei die Erkrankung bei Erwachsenen selten in der unteren Extremität beginnt und meist leichter verläuft [68].

Definitionsgemäß ist das wichtigste Unterscheidungsmerkmal zwischen der idiopathischen Torsionsdystonie und der Dopa-responsiven Dystonie der therapeutische Effekt von L-Dopa [82, 106].

Die ITD ist die häufigste der erblichen Dystonien [92] mit einer geschätzten Genfrequenz von 1:6000 bei Ashkenazi Juden (wegen einer Gründer-Mutation vor ca. 350 Jahren) [98] und einer Genfrequenz von 1:200000 bei der restlichen Bevölkerung [15]. Das bei der Erkrankung mutierte Gen ist im langen Arm von Chromosom 9q34 (*DYT1*) lokalisiert [61] (Abb. 1-3), und als häufigste Mutation in dieser Region wurde eine Deletion von drei Basenpaaren in der codierenden Sequenz des Gens für ein Protein namens TorsinA gefunden, welches eine ATP-bindende Domäne enthält [92]. Die pathophysiologische Bedeutung dieses Proteins für die ITD ist noch nicht geklärt.

Obwohl die Neuropathogenese der primären Dystonien noch lange nicht vollständig aufgeklärt ist, wird angenommen, daß alle primären Dystonien aus einem Ungleichgewicht der neuronalen Transmission in den Basalganglien resultieren, so wie die Dopa-responsive Dystonie und auch die sekundären Dystonien, bei denen Läsionen im Nucleus caudatus, Putamen und Globus pallidus gefunden wurden [6, 22]. Da die ITD im Gegensatz zur DRD nicht auf L-Dopa reagiert, liegt der Defekt vielleicht eher bei der Freisetzung von Dopamin als in dessen Synthese [92].

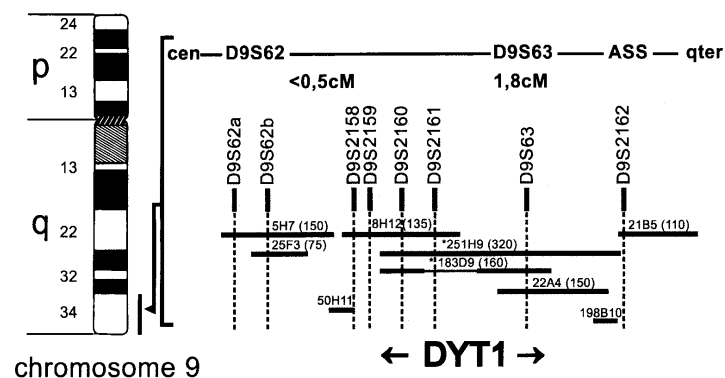


Abb. 1-3 Genlocus von *DYT1* auf Chromosom 9, aus [49]

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Patienten mit Dopa-responsiver Dystonie oder Verdacht auf diese Erkrankung nach weiteren, bisher nicht beschriebenen Mutationen im für die GTP-Cyclohydrolase I codierenden Gen (*GCHI*) auf Chromosom 14 zu suchen und die Methode der Mutationsanalyse so zu verbessern, daß sie in der klinischen Routinediagnostik angewandt werden kann.

Außerdem sollten Patienten, die keine Mutation in *GCHI* aufwiesen und nicht eindeutig Dopa-responsiv waren, wegen der ähnlichen Symptomatik bei Dopa-responsiver Dystonie und idiopathischer Torsionsdystonie (ITD) auf eine Veränderung im bei der ITD mutierten Gen im *DYT1*-Locus untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Geräte und Zubehör

Biometra UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen
Bioprint System	Mitsubishi, Japan
Brutschrank BK 5060 E	Heraeus, Hanau
Cronex Medical X-Ray Film (35,6cm x 43,2 cm)	Sterling Diagnostic Imaging
Cronex Röntgenkassetten	Sterling Diagnostic Imaging
DNA/RNA Calculator Gene Quant II	Pharmacia Biotech
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus, Norwalk
Geiger-Müller-Zählrohr: Minimonitor 900	American Bioanalytical
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schüll, Dassel
Gelkammern: horizontal	von Keutz Laborgeräte, Reiskirchen
Model S2 (vertikal)	Gibco BRL, Life Technologies, Inc, USA
Haftsichtfolie	Roth, Karlsruhe
Heizblock: Techne-Driblock DB3	Techne
Heizplatte: Silit-Induction	Silit
Eiszubereiter: Icematic F100 Compact	Icematic
Mikrotiterplatten: Thermowell C96	Costar
Netzgeräte: Biometra	Biometra, Göttingen
2297 Macrodrive 5	LKB Bromma
pH-Meter 761	Calimatic
Pipetten: P10, P20, P200, P1000	Gilson
Pipettenspitzen: gelb, blau, kristall, weiß	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße: 1,5ml, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank Mobilen W 90	Waldner-Laboreinrichtung
Slab Gel Dryer Model SE 1160	Hoefer Scientific Instruments
Stirrer / Hotplate: MEA 12	IDL
UV-Transilluminator 2011 Macrovue	LKB Bromma
Vortex: RS 1	IDL
Waagen: PM 400	Mettler
PM 4800 Delta Range	Mettler

Wasserbäder: W22	Medingen
Wasserbad	Köttermann Laborgeräte
Wippschüttler: einfach	Adams Nutator
beheizbar (Inkubationsschüttler)	GFL
Zentrifugen: Biofuge A	Heraeus, Hanau
Biofuge 13R	Heraeus, Hanau
Eppendorf Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
IEC HN-S II Centrifuge	International Equipment Company
Superspeed RC2-B	Sorvall
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Falcon

2.2 Chemikalien

Acrylease	Stratagene
Agar Agar	Serva
Agarose	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva/Boehringer Ingelheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto R Tryptone	DIFCO
Bacto R Yeast Extract	DIFCO
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau-Natriumsalz	Serva
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform, stabilisiert	Merck, Darmstadt
NN-Dimethylformamide	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Entwickler: Cronex Mix MD-Developer (ABC)	Sterling Diagnostic Imaging

Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Klinikumsapotheke
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fixierer: Cronex Mix MF-E-Fixer (AB)	Sterling Diagnostic Imaging
Gelatine	Roth, Karlsruhe
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
α -D-(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin 87 %	Merck, Darmstadt
Haemo-Sol	Dade AG, Düringen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HBSS 10x (Hanks´ gepufferte Salzlösung)	Gibco BRL
Isobutanol, reinst	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Klenow Fragment	Promega
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
MDE Gellösung	Biozym
Mineral Oil	Sigma
MgCl ₂ -Solution 4,9 mM	Sigma
3-[n-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
NaOH-Plättchen	Merck, Darmstadt
Perfect Match	Stratagene
Phenol, kristallin, reinst	Merck, Darmstadt
Plasmid Midikit	Qiagen, Hilden

Rotiphorese Lösung Gel 40 19:1	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Serva, Heidelberg
D-(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Sigma
Serdogel für SSCP	Serva/Boehringer Ingelheim
Sigmacote	Sigma
Silikon-Fett	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	Amersham International, England
Tris (Trishydroxymethylaminoethan)	USB, Braunschweig
Tris-HCl	USB, Braunschweig
Trizma Base	Sigma
T7 sequencing kit	Pharmacia
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.3 Enzyme und Nukleotide

Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Promega, Heidelberg
DNA Größenstandards:	Invitrogen, San Diego
100 bp ladder	
1 kb DNA ladder	Gibco BRL
Oligonukleotide	MWG Biotech AG, Ebersberg
Oligonukleotide	Institut für Virologie, Gießen
Oligonukleotide	Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide	Gibco BRL
Proteinase K	Boehringer, Ingelheim

Restriktionsendonukleasen:	Eco R I	Appligene-Oncor, Frankreich
	Eco R V	Appligene-Oncor, Frankreich
	Hind III	Pharmacia
Taq DNA Polymerase		Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase		Boehringer Mannheim
T4 Polynucleotide Kinase, 30 U/l		USB, Braunschweig
Vektor: pBlueskript SK (+/-) phagemid		Stratagene, La Jolla, USA

2.4 Radionukleotide

α - ³² PdCTP	Amersham International, England
α - ³⁵ SdATP	Amersham International, England
γ - ³² PdATP	Amersham International, England

2.5 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml H ₂ O dd Aliquots bei -20 °C lagern
DNA-Auftragspuffer (10x) für TBE-Gele	50 % Saccharose 2 M Harnstoff 0,1 M EDTA 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanolblau ad mit 10x TBE

dYT-Medium	16 g Trypton 10 g Yeast Extract 10 g NaCl ad 1000 ml mit H ₂ O dd autoklavieren
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Yeast Extract 10 g NaCl ad 1000 ml mit H ₂ O dd autoklavieren
LB-Agar-Platten	500 ml LB-Medium 7,5 g Agar Agar autoklavieren, etwas abkühlen 1000 µl Ampicillin (50 mg/ml) 1000 µl X-Gal (25 mg/ml) 1000 µl IPTG (25 mg/ml)
10x TBE	545 g Trizma Base 278 g Borsäure 250 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0 ad 5000 ml H ₂ O dd
100x TE	12,114 g Tris-HCl 0,3722 g EDTA ad 100 ml H ₂ O dd
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) Stammlösung	20 mg/ml NN-Dimethylformamid
Puffer für PCR	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,1 % Gelatine

Nuclei-Extraction-Buffer		54,75 g Saccharose 2,5 ml 1 M MgCl_2 5 ml Triton X-100 5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0 ad 500 ml mit H_2O dd sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
DNA-Etraction-Buffer		4 ml 1 M Tris HCl, pH 8,0 4 ml 0,5 M EDTA, pH8,0 2 ml 5 M NaCl ad 100 ml mit H_2O dd sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
Minipräp-Lösungen	Lösung 1 (Lysepuffer)	50 mM Glucose 25 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA ad 100 ml mit H_2O dd autoklavieren, bei 4 °C lagern
	Lösung 2 (Denaturierungspuffer)	0,4 M NaOH 2 % SDS im Verhältnis 1:1, frisch ansetzen!
	Lösung 3	60 ml 5 M Kac 11,5 ml Eisessig ad 100 ml mit H_2O dd auf pH 4,8 einstellen, bei 4 °C lagern
6 % Acrylamid-Stammlösung (7 M Urea, 1xTBE)		75 ml Rotiphorese Lösung Gel 40 (19:1) 350 ml Urea (10 M) 50 ml 10xTBE 25 ml Bidest

8 % Acrylamid-Stammlösung (7 M Urea, 1xTBE)	100ml Rotiphorese Lösung Gel 40 (19:1) 350 ml Urea (10 M) 50 ml 10xTBE
Zeitsparalkohol	Ethanol absolut 0,15 M Na-Acetat pH 5,2
Transformationspuffer (TFB) I	100 mM RbCl ₂ 40 mM MnCl ₂ 30 mM KAc 10 mM CaCl ₂ mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen
Transformationspuffer (TFB) II	10 mM MOPS 10 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin

3 Methoden

3.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde aus venösem Blut die genomische DNA aus den kernhaltigen Zellen durch alkalische Lyse in zwei Schritten extrahiert. Die bei der Kern-Extraktion verwendete Lösung enthält als nichtionisches Detergens Triton X-100 und Saccharose, die ein sofortiges Aufplatzen des Kerns verhindern und diesen so für den zweiten Schritt, die DNA-Extraktion, bewahren, in dem durch EDTA und SDS die Kernmembran zerstört wird.

5 ml EDTA-Blut wurden dazu mit 35 ml 1 x HBSS in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) gewaschen und 10 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zu 1 cm über der die Leukozyten enthaltenden Interphase verworfen.

Zur Isolierung der Zellkerne gab man dann 15 ml Kern-Extraktions-Puffer in das Zentrifugenröhrchen, mischte mehrmals sehr gründlich und ließ das Gemisch für 30 Minuten auf Eis stehen. Die Zellmembran wurde dadurch lysiert und gab die Zellkerne frei, die bei der anschließenden Zentrifugation über 10 Minuten bei 1300 x g pelletiert wurden. Der Überstand wurde verworfen. Die Lagerung des Pellets nach diesem Schritt bei -80 °C war möglich.

Zur Weiterverarbeitung wurde das Pellet in 250 µl DNA-Extraktions-Puffer gelöst. Die Kernmembran wurde lysiert durch tropfenweises Hinzufügen von 250 µl des Gemischs DNA-Extraktions-Puffer / 1 % SDS und nachfolgender Inkubation bei 50 °C im Wasserbad über 3 Stunden. Die gelösten Proteine befanden sich zusammen mit den Nukleinsäuren in wäßriger Lösung.

Zur Proteinentfernung erfolgte danach eine Phenol/Phenol-Chloroform/Chloroform-Extraktion (3.1.1). Um die chromosomale DNA zu fällen, wurde der Überstand aus dem letzten Schritt der Chloroform-Extraktion in dem zweifachen Volumen Äthanol / 0,15 M Natriumacetat, pH 5,2 aufgenommen, und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt, bis ein Präzipitat erschien. Dieses wurde pelletiert, gewaschen und getrocknet und anschließend in 200 µl 1 x TE/RNase über mehrere Tage im 50 °C Wasserbad gelöst.

3.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Durch die Behandlung mit Phenol werden Proteine aus Nukleinsäurelösungen entfernt. Diese organischen Lösungsmittel fällen die Proteine aus, während die Nukleinsäuren in wässriger Lösung bleiben. Chloroform dient vor allem der Entfernung von Phenolresten.

Dieses Verfahren wurde verwendet zur Reinigung von genomischer DNA und Plasmid-DNA. Zur Extraktion genomischer DNA wurde eine zweimalige Behandlung mit Phenol gefolgt von einem Phenol-Chloroform- und einem Chloroform-Schritt. Für die Extraktion von Plasmid-DNA genügte die einmalige Behandlung mit Phenol-Chloroform.

Zur Durchführung wurde zu der Nukleinsäurelösung je nach Qualität der DNA (genomische DNA oder Plasmid-DNA) 1 Volumenanteil Phenol oder Phenol-Chloroform (1:1 gemischt) gegeben, gründlich gemischt und bei maximaler Drehzahl für 10 Minuten zentrifugiert. Die ausgefällten Proteinmoleküle befanden sich dann in der unteren organischen Phase und der Interphase. Die obere, wässrige, DNA enthaltende Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen.

Gegebenenfalls wurde dann mit dieser Lösung eine erneute Phenolextraktion, oder eine Extraktion mit Phenol-Chloroform oder nur Chloroform (entfernt vorhandene Phenolreste) wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die in der extrahierten Nukleinsäurelösung enthaltene DNA durch Äthanol gefällt.

3.1.2 Fällung von DNA

Bei der DNA-Extraktion aus Vollblut, der Minipräparation von Plasmid-DNA und dem Fällen von Primern soll niedrig konzentrierte Nukleinsäurelösung angereichert, gereinigt und in geeignete Puffer überführt werden. Dies wird durch die Äthanolfällung erreicht. In Gegenwart von Salzen (einwertige Kationen wie Na^+) und bei Temperaturen unter $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fällt 70 %iges Äthanol die Nukleinsäuren sehr wirksam aus, da die Ionen den Nukleinsäuren die Hydrathülle entziehen und diese dadurch nicht mehr wasserlöslich sind.

Zur Präzipitation der DNA wurde die wässrige DNA-Lösung in der Regel mit 2-3 Volumeneinheiten absoluten Äthanol / 0,15 M Natriumacetat, pH 5,2 versetzt, gründlich gemischt und, falls bei kleinen DNA-Konzentrationen kein Präzipitat erschien, mindestens 30 Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Anschließend wurde die ausgefallene DNA durch 10-20minütige Zentrifugation bei $\geq 10000 \times g$ pelletiert und zweimal mit $200\text{ }\mu\text{l}$ 70 %igem Äthanol zur Entfernung von Salzen gewaschen. Vor dem Abnehmen des Überstandes wurde erneut zentrifugiert, damit das Pellet an der Reagenzglaswand haften blieb. Danach wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

Die DNA wurde dann in entsprechenden Puffern oder in doppelt destilliertem Wasser (Aqua bidest.) aufgenommen und gelöst.

3.1.3 DNA-Extraktion mit Hilfe des BACC2-Kits (Nucleon, Amersham)

Alternativ zur in 3.1 beschriebenen Methode wurde die DNA auch mithilfe des BACC2-Kits nach Anleitung des Begleitheftes isoliert. Bei diesem Verfahren wird die Zelle mit einem dem Kern-Extraktions-Puffer ähnlichen Reagenz A alkalisch lysiert. Ein nicht näher beschriebenes Reagenz B lysiert den Kern. Die Deproteinisierung erfolgt durch Natriumperchlorat mit anschließender DNA-Extraktion unter Verwendung von Chloroform und einem speziellen „Nucleon-Resin“, das als feste Schicht der besseren Trennung der DNA- und Protein-Phasen dient und selbst Proteine bindet.

Bei höheren Kosten überwiegt der Vorteil dieser Methode durch die wesentlich schnellere Verarbeitung, den Verzicht auf das toxische und kokarzinogene Phenol und eine sehr hohe DNA-Ausbeute. Ein Nachteil ist jedoch die geringere Haltbarkeit der DNA.

3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und Oligonukleotiden

Die Konzentration von DNA und Oligonukleotiden kann nach absorptionsspektrometrischen Prinzipien in einem Photometer bestimmt werden. Die Methode beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz ($A = \epsilon \cdot c \cdot d$). Die zugrundeliegenden Formeln zur Berechnung der vorhandenen Konzentration sind [77]:

Doppelsträngige DNA: $c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = A_{260} / 0.020$

Oligonukleotide: $c \text{ (pmol/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 100 / (1,5N_A + 0,71N_C + 1,20N_G + 0,84N_T)$

mit A_{260} = Absorption bei 260 nm Wellenlänge und einer Schichtdicke d von 1 cm und $N_{A,C,G,T}$ = Anzahl der jeweiligen Nukleotide im Oligonukleotid. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ der doppelsträngigen DNA und der Nukleotide geht dabei in die Zahlenwerte ein, mit $\epsilon(\text{dsDNA}) = 0,020(\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(A) = 15200(\text{mol/l})^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(C) = 7050(\text{mol/l})^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(G) = 12010(\text{mol/l})^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon(T) = 8400(\text{mol/l})^{-1}\text{cm}^{-1}$ für die Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Es wurden 2 μl der zu messenden Substanz mit 198 μl Aqua bidest. verdünnt. 200 μl des gleichen Wassers wurden bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ in dem Photometer (Pharmacia) als Leerprobe eingesetzt. Bei einer Schichtdicke d der Küvette von 1 cm wurde dann die Absorption A der Probe bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ gemessen. Das Gerät bestimmte dann aus den vorher eingegebenen Parametern (doppelsträngige DNA, Oligonukleotide mit Basensequenz und Verdünnung) die Konzentration der Ausgangslösung.

3.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der 1985 durch Kary Mullis entwickelten PCR („Polymerase Chain Reaction“) können in vitro DNA-Sequenzen schnell vervielfältigt (amplifiziert) werden, bei denen zumindest die Nukleotidsequenzen der Randbereiche bekannt sind [99]. Diese Information benötigt man für die Konstruktion zweier Oligonukleotid-Primer („Starter-DNA“) mit je 15-30 Nukleotiden, die komplementär zur Ziel-DNA und antiparallel zueinander binden und so als Startpunkte für die Synthese der komplementären Stränge dienen.

Die Polymerasekettenreaktion beruht auf zyklischer Temperaturveränderung, die in speziellen „Thermocyclern“ erfolgt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer („annealing“) und DNA-Synthese („extension“).

Menschliche genomische DNA wird bei etwa 93-95 °C denaturiert [114], d. h. die doppelsträngige DNA wird in zwei Einzelstränge getrennt, an die sich im nächsten Schritt bei Temperaturen zwischen 50 und 70 °C die Primer, sogenannte Amplimere, anlagern (hybridisieren). In Anwesenheit der DNA-Vorstufen, den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP, beginnt die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase bei 72 °C ausgehend vom 3'-Ende der hybridisierten Primer, DNA zu synthetisieren. Als DNA-Polymerase hat sich die des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* bewährt (*Taq*-

DNA-Polymerase), da sie bei einem Temperaturoptimum von ca. 80 °C selbst Temperaturen von über 94 °C für gewisse Zeit toleriert.

Folgt nun wieder eine Denaturierung, dienen auch die neu synthetisierten Stränge als Matrize, so daß die Vervielfältigung der DNA annähernd exponentiell verläuft und nach wenigen Zyklen die durch die beiden Primer begrenzten und damit erwünschten Produkte überwiegen. Nach 20 Zyklen sollte sich die gesuchte DNA 2^{20} -fach vermehrt haben, vorausgesetzt, daß die Ausbeute in jedem Zyklus 100-prozentig ist [75]. Jedoch verhindern in jedem Zyklus mehrere Faktoren eine 100-prozentige Ausbeute, dieser Effekt wird in späteren PCR-Runden verstärkt. Nach 25 bis 30 Zyklen begrenzt die Enzymmenge die Reaktion bei molarem Überschuß der Ziel-DNA. Die PCR-Reaktionsbedingungen sind so zu wählen, daß eine möglichst hohe Ausbeute innerhalb der Zyklen erfolgt. Im Anschluß an die zyklischen Temperaturveränderungen folgt eine längere Synthesephase („final extension“), bei der unvollständige Produkte komplettiert werden sollen. Die Reaktion wird beendet durch Kühlung auf Temperaturen ≤ 15 °C.

3.3.1 Konstruktion der Primer

Zur Konstruktion der Primer wurde das Computer-Programm OLIGOTM verwendet. Für diese Dissertationsarbeit genügte es, die Primer genau komplementär zur DNA-Vorlage zu konstruieren. Bei einer Primerlänge zwischen 18 und 25 Nukleotiden wurde darauf geachtet, daß die Schmelztemperatur (T_d , vom Programm ermittelt) zwischen 50 und 70 °C liegt und sich im Primerpaar möglichst gering unterscheidet. Nach Möglichkeit sollten die vier Basen in den Primern gleich häufig vertreten sein, und die Primerpaare sollten weder inter- noch intramolekular komplementär sein, um zu verhindern, daß sich Primerdimere ausbilden und zusätzlich falsche kurze DNA-Abschnitte polymerisiert werden [75].

Ein Teil der Primer wurde der Literatur entnommen bzw. danach modifiziert (siehe 3.3.3, Tab. 3-1 bis 3).

3.3.2 Primer fällen

Die Primersynthese wurde in Auftrag gegeben. Meistens wurde uns das Oligonukleotid als getrocknetes Pellet zugesandt, das nur in Wasser gelöst werden mußte. Die Primer aus dem Institut für Virologie, Gießen, waren jedoch in Ammoniak gelöst und mußten vor der weiteren Verarbeitung gefällt werden.

Dazu wurden 360 µl des in Ammoniak gelösten Primers mit 40 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 1200 µl eiskaltem (-20 °C) 100 %igen Äthanol gemischt und mindestens eine Stunde bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde das ausgefallene Oligonukleotid pelletiert mit 1000 µl 80 %igem Äthanol (-20 °C) gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde dann in 100 µl Aqua bidest. aufgenommen und im Wasserbad bei 50 °C über Nacht gelöst.

3.3.3 Amplifikation spezifischer Sequenzen durch PCR

Die Oligonukleotid-Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primer sowie die entsprechenden Produktgrößen und die „Thermocycler“-Programme sind den Tabellen 3-1 bis 3 zu entnehmen.

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für eine spezielle PCR zu ermitteln, wurde zunächst ein nicht-radioaktiver 20 µl-Ansatz („Kalt-PCR“) mit einer *Taq*-DNA-Polymerase getestet. Die variablen Parameter waren vor allem die MgCl₂-Konzentration (0/1/2 mM) und die Anlagerungs-Temperatur, bei schwierigen PCRs wurden zusätzlich DMSO und Perfect-Match (Stratagene) oder Qia-*Taq*-DNA-Polymerase und Q-Solution (Qiagen) eingesetzt.

Der Ansatz erfolgte in Mikrotiterplatten oder in Multi[®]-Ultra-Tubes. Als Ausgangs-DNA („Template“) diente die DNA von nicht-betroffenen, nur durch Heirat verwandten Familienangehörigen („Spouses“, Negativkontrollen). Die verwendeten „Thermocycler“ waren der Biometra UNO Thermoblock und das Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Für die Primer GCH 2.2, GCH 4.1, GCH 4.2, GCH 5.2, DYT, AMEL, D21S11, FGA und VWA ergaben sich folgende Bedingungen für den Ansatz (siehe auch Tab. 3-1 bis 3-3):

1 µl	„Template“-DNA (40 ng/µl)
1 µl	Primer A (15 pmol/µl)
1 µl	Primer B (15 pmol/µl)
0/0,8/1,6 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer
4 µl	Kalt-Nukleotid-Mix
0,5 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
ad 20 µl	Aqua bidest.

Bei dem Primer GCH 6.1 wurden außerdem 1 µl DMSO und 0,2 µl Perfect Match hinzugefügt. 0,1 µl Qia-*Taq*-DNA-Polymerase wurde für die Primer D18S51, D19S253, THO 1, D5S2360 und GCH 3.2 und in Verbindung mit 4 µl Q-Solution für GCH 1.4-6 eingesetzt.

Bei bereits ermittelten Reaktionsbedingungen wurde für mehr als drei Proben ein Gesamtreaktionsgemisch („Premix“) entsprechend der Probenanzahl aus allen Reagenzien angefertigt. Je 1 µl „Template“ wurde in der Mikrotiterplatte vorgelegt, erst dann wurden 19 µl des „Premix“ hinzupipettiert.

Nach Überschichten mit je 1 Tropfen Mineralöl wurden die Mikrotiterplatten in den schon aufgeheizten „Thermocycler“ mit dem entsprechenden Programm gestellt („Warmstart“), um die DNA zu denaturieren bevor die *Taq*-DNA-Polymerase aktiviert wurde und unspezifische Produktbildung während des Aufheizens zu vermeiden.

Nach Ablauf der PCR wurden die Produkte mittels der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (3.7.1).

Tab. 3-1 Primer für das bei der idiopathischen Torsionsdystonie mutierte Gen (*DYT1*)

Primer	Oligonukleotid-Sequenz	Größe (bp)	Programm
DYT1 A	CCT GGA ATA CAA ACA CCT A	250	94 °C – 3 min
DYT1 B	GGT GGA AGG ACT GAG TGT TG		94 °C – 30 s
			50 °C – 30 s 35 Zyklen
			72 °C – 30 s
			72 °C – 5 min

Anmerkung: Die Sequenzierung wurde nur mit DYT1 A durchgeführt

Tab. 3-2 Primer für das GCH1-Gen und deren PCR-Bedingungen

Exon	Primer	Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')	Größe	Programm
1	GCH 1.4 A GCH 1.4 B	GTC CTT CCC GAA CGG CAG CTG CGC GCT CTT GGC CT	178 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 68 °C - 30 s 38 Zyklen 72 °C - 30 s 72 °C - 5 min
	GCH 1.5 A GCH 1.5 B	AGG TBC AGC AAT GGG TTC GAG CTC AGG ATG GAC GAG T	194 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 60 °C - 30 s 40 Zyklen 72 °C - 15 s 72 °C - 5 min
	GCH 1.6 A GCH 1.6 B	AAC GAG CTG AAC CTC CCT AAC CCC GCA CGC TCT AGC AG	188 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 65 °C - 30 s 35 Zyklen 72 °C - 30 s 72 °C - 5 min
2	GCH 2.2 A GCH 2.2 B	GAC ATG TTA CTA AAG CAA GCC TTA AAT TGC TGG GAA ACA AC	176 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 61 °C - 30 s 30 Zyklen 72 °C - 30 s 72 °C - 5 min
3	GCH 3.2 A GCH 3.2 B	TTC TTT CTA TAT TTC CTT ATT TTG GTC CTA TAA ACC TGT ATT CTT GT	181 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 55 °C - 1 min 35 Zyklen 72 °C - 15 s 72 °C - 5 min
4	GCH 4.1 A GCH 4.1 B	GTC CTT TTT GTT TTA TGA GGA AGG C GGT GAT GCA CTC TTA TAA TCT CAG C [48]	288 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 59 °C - 30 s 30 Zyklen 72 °C - 30 s 72 °C - 5 min
	GCH 4.2 A GCH 4.2 B	ATG AGG AAG GCT TAT CAA TTT TGG GTG ACA GAG CAA GAC T	195 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 67 °C - 30 s 10 Zyklen 94 °C - 30 s 62 °C - 30 s 20 Zyklen 72 °C - 30 s 72 °C - 5 min
5	GCH 5.1 A GCH 5.1 B	AGC TCC TTA TCA CAT CCA TTC TAG TGC ACC ATT ATG AC	152 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 60 °C - 30 s 10 Zyklen 94 °C - 30 s 55 °C - 30 s 25 Zyklen 72 °C - 15 s 72 °C - 5 min
6	GCH 6.1 A GCH 6.1 B	ACC AAA CCA GCA GCT GTC TAC TCC AAT GCT ACT GGC AGT ACG ATC GG [48]	237 bp	94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 60 °C - 1 min 33 Zyklen 60 °C - 6 min

Tab. 3-3 Polymorphe Marker (STRP) für Vaterschaftsnachweise und deren PCR-Bedingungen

Marker	Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')	Größe (bp)	Pm * Value	Programm
AMEL A ^a AMEL B ^a	CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG	106, 112	0,5	94 °C - 3 min 94 °C - 1 min 60 °C - 1 min 30 Zyklen 72 °C - 1 min 72 °C - 5 min
D21S11 A ^a D21S11 B ^a	ATA TGT GAG TCA ATT CCC CAA G TGT ATT AGT CAA TGT TCT CCA G	205-249	0,051	
FGA A ^a FGA B ^a	GCC CCA TAG GTT TTG AAC TCA TGA TTT GTC TGT AAT TGC CAG C	177-231	0,044	
VWA1 A ^b VWA1 B ^a	CCC TAG TGG ATG ATA AGA ATA AT GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG	126-166	0,064	
D18S51 A ^a D18S51 B ^a	CAA ACC CGA CTA CCA GCA AC GAG CCA TGT CAT GCC ACT G	275-323	0,029	
D19S253 A D19S253 B	ATA GAC AGA CAG ACG GAC T GGA GTG GAG ATT ACC CCT	205-241	0,082	
THO1 A THO1 B	CTG AAA AGC TCC CGA TTA T GTG ATT CCC ATT GGC CTG T	154-178	0,086	
D5S2360 A D5S2360 B	ATT AGT AAG AAT CAA ATG CAG A CTC TCC ACC TCA ACA TAT CT	142-180		94 °C - 3 min 94 °C - 30 s 56 °C - 45 s 30 Zyklen 72 °C - 15 s 72 °C - 5 min

* matched probability, ^a aus [125] übernommen, ^b nach [125] modifiziert, ^c aus [60] übernommen

3.3.4 Verschachtelte PCR („nested“ PCR)

Erhält man durch eine PCR mehrere Produkte, die sich als unscharfe Bande („smear“) im Agarosegel manifestieren, besteht die Möglichkeit, durch eine „nested“ PCR ein spezifisches Produkt zu erhalten. Es werden dabei zwei PCRs hintereinander geschaltet, wobei man für die zweite PCR das Reaktionsprodukt der ersten als „Template“ benutzt, und die Primer-Grenzen innerhalb des ersten Produktes liegen müssen.

3.3.5 Radioaktiv markierte PCR („Heiß-PCR“)

Im Vergleich zur nicht-radioaktiven PCR („Kalt-PCR“) änderte sich bei der radioaktiv markierten PCR lediglich die Nukleotid-Zusammensetzung.

„Premix“:	4 µl	„Heiß“-Nukleotid-Mix
	1 µl	Primer A (15 pmol/ml)
	1 µl	Primer B (15 pmol/ml)
	0/0,8/1,6 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	2 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer
	0,5 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
	(sonstige Zusätze)	
	0,1 µl	α- ³² P-dCTP (10 µCi/µl)
	ad 19 µl	Aqua bidest.

Auch für die radioaktiv markierte PCR wurde je 1 µl „Template“-DNA (40 ng/µl) in die Mikrotiterplatten vorgelegt, mit 19 µl „Premix“ durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (Kontaminationsgefahr!) gemischt, dann mit 1 Tropfen Mineralöl überschichtet und schließlich „warm“ gestartet. Nach erfolgter Amplifikation wurde die PCR mit 7 µl Stopppuffer gestoppt, 3 Minuten bei 94 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und bis zur Gelelektrophorese bei -20 °C aufbewahrt.

Das radioaktive PCR-Produkt wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht (3.5.2.1).

3.4 Klonierung eines PCR-Produktes

Bei der Klonierung eines PCR-Produktes wird das gewünschte DNA-Stück *in vitro* mit einem Vektor verbunden (Ligation) und darüber in eine geeignete Wirtszelle eingeschleust (Transformation), in der es dann mit jeder Zellteilung vervielfältigt wird. Die Amplifikation erfolgt im Vergleich zur PCR-Methode spezifischer, so daß die Sequenzierung der amplifizierten DNA, direkt am Vektor (hier pBluscript SK) in der Regel eine hohe Qualität ermöglicht.

im Schüttler inkubiert. Mit dieser Zellkultur wurde dann eine Plasmidminipräparation wie unter 3.4.6 beschrieben durchgeführt. 1 µl der so bereiteten Plasmid-DNA wurde dann entsprechend der Transformation des Ligationsansatzes (3.4.5.2) in kompetente XL1-Zellen (3.4.5.1) transformiert und anschließend auf eine dYT-x-Gal/Amp-Platte ausplattiert und wiederum über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte dann nach Anleitung des Kits.

Eine der „frisch“ kultivierten Kolonien wurde mit einem sterilen Zahnstocher in ein Reagenzglas mit 3 ml LB-Medium + Ampicillin überführt und für 8 Stunden bei 37 °C im Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann in einem 25 ml Ansatz LB-Medium + Amp auf 1/500 verdünnt und unter gleichen Bedingungen für weitere 12-16 Stunden inkubiert. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation mit 6000 x g für 15 Minuten bei 4 °C „geerntet“, während der Überstand dekantiert wurde. Die Zellen wurden dann in 4 ml RNase enthaltenden Puffer P1 resuspendiert und mit 4 ml Puffer P2 (NaOH/SDS) alkalisch lysiert. Die optimale Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur bedingte maximale Ausbeute von herausgelöster Plasmid-DNA, ohne chromosomale DNA freizusetzen. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurde das Lysat neutralisiert und durch Inkubation auf Eis für 15 Minuten präzipitiert. Durch die hohe Salz-Konzentration fielen SDS-Salz-Komplexe aus und banden denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zellbestandteile. Die Plasmid-DNA blieb wegen ihrer geringen Größe in Lösung. Die anschließende Zentrifugation mit 20000 x g für 30 Minuten bei 4 °C trennte dann das Präzipitat von dem die Plasmid-DNA enthaltenden Überstand. Dieser wurde in ein neues Gefäß überführt und nochmals unter gleichen Bedingungen für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann durch ein vorher mit 4 ml Puffer QBT equilibriertes „QIAGEN-tip 100“ filtriert. Die Plasmid-DNA band dabei an den „QIAGEN Resin“, der positiv geladenes Diethylaminoäthanol (DEAE) enthält, während RNA und Zellproteine passierten. Das „QIAGEN-tip“ wurde dann zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen, um Spuren von RNA und Protein zu entfernen. Durch Zugabe von 5 ml Puffer QF verlor DEAE seine positive Ladung, die Plasmid-DNA löste sich von dem „QIAGEN Resin“ und wurde in einem sauberen Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

Anschließend wurde mit dem Eluat eine Äthanol-Fällung wie unter 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Das den Plasmid-Vektor enthaltende Pellet wurde in 150 µl 1 x TE gelöst.

3.4.1.2 Vektor zur Ligation vorbereiten

Als Vektor diente das Plasmid pBluescript SK (+/-), das zur Ligation des PCR-Fragments mit dem Restriktionsenzym EcoR V geschnitten wurde („blunt ended“ Ligation).

Für den Restriktionsverdau wurden 40 µl des pBluescript-Vektors aus 3.4.1.1 mit 5 µl Puffer B und 5 µl EcoR V vermischt und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP = Calf Intestate Phosphatase), die die freien 5'-Phosphatgruppen des Vektors abspaltet und damit eine Religation der Vektorenden weitgehend verhindert. Dazu wurden dem Ansatz nach dem Restriktionsverdau 2 µl CIP und die entsprechende Menge CIP Puffer hinzugefügt. Dies wurde bei 37 °C inkubiert. Nach einer halben Stunde wurde noch einmal 1 µl CIP hinzugegeben, und nach weiteren 30 Minuten konnte nach Auffüllen auf 200 µl mit 1 x TE eine Phenol/Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt werden (3.1.1). Nach dem Fällern der Plasmid-DNA mit 500 µl Äthanol / 0,15 M Natriumacetat, pH 5,2 und anschließendem Waschen (3.1.2) wurde das Pellet in 40 µl 1 x TE im Wasserbad (37 °C) gelöst.

0,5 µl wurden dann im Vergleich mit dem „Insert“ (3.4.2.2) auf einem 1 %igen Agarose-Gel getestet.

3.4.2 Ligation

Bei der Ligation durch die T4-DNA-Ligase erfolgte die Insertion des PCR-Produktes („Insert“) in die Vektor-DNA (pBluescript SK). Auch das PCR-Produkt mußte dazu vorbereitet werden.

3.4.2.1 Klenow-Verdau des PCR-Produktes

Zunächst wurde eine „Kalt-PCR“ in fünf 20 µl-Ansätzen durchgeführt, so daß 100 µl PCR-Produkt als Amplikon eingesetzt werden konnten.

Die *Taq*-DNA-Polymerase fügt jeweils ein einziges, nicht zur Matrize passendes Nukleotid, meist ein Adenosin, an das 3'-Ende der DNA an [75], so daß die Ligation mit glatten („blunt“) Enden gestört würde. Deshalb soll das PCR-Produkt mit dem Klenow-Fragment (besitzt die Polymerase-Aktivität der DNA-Polymerase I von *E. coli* ohne die 5'-3' Exonu-

klease-Aktivität) behandelt werden. Durch seine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität entfernt das Klenow-Fragment die überzähligen Nukleotide und „glättet“ so das PCR-Produkt.

100 µl PCR Produkt wurden mit 1 µl Klenow-Fragment (5U/λ) gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C und weitere 5 Minuten bei 65 °C inkubiert.

3.4.2.2 Phosphorylierung des PCR-Produktes

Das 5'-Ende des PCR-Produktes besteht aus Primer und ist dort nicht phosphoryliert. Für die Ligation wird jedoch energiereiches Phosphat am 5'-Ende benötigt, so daß das PCR-Produkt noch vor der Ligation phosphoryliert werden muß.

PCR-Produkt aus 3.4.2.1 + 5 µl ATP (10 mM)
 + 9 µl 10 x T4 PNK-Puffer
 + 4 µl T4 PNK (1:10 verd. mit Kinase Verdünnungspuffer),
30 Minuten bei 37 °C und 10 Minuten bei 70 °C inkubieren.

Um das PCR-Produkt von den Proteinen zu befreien, wurde es nach der Phosphorylierung in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, und die DNA aus den ausgeschnittenen Banden wurde mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) extrahiert (3.5.1.1).

Das so gereinigte DNA-Extrakt wurde dann neben dem Vektor auf einem kleinen Agarosegel ausgetestet, um das Verhältnis von Eluat („Insert“) und Vektor für den Ligationsansatz abzuschätzen.

3.4.2.3 Ligationsansatz

5 µl Eluat (~120 ng „Insert“)
1,5 µl (~50 ng) Vektor-DNA (pBluescript SK, EcoR V geschnitten, 3.4.1.2)
1 µl Ligase 10 x Puffer
1 µl T4 Ligase
1,5 µl Aqua bidest.

Die Ligation erfolgte über Nacht (16 Stunden) bei Raumtemperatur.

3.4.3 Transformation und Kultur

Bei der Transformation wird der Plasmid-Vektor, der potentiell das Insert enthält, in die Bakterienzelle aufgenommen. Dafür müssen die Bakterienzellen vorbereitet werden.

3.4.3.1 Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Dies erfolgt durch chemische Behandlung der Bakterien in Kälte. Dabei wird durch Verdrängung der Mg^{2+} -Ionen aus der äußeren Bakterienmembran mittels Ca^{2+} -Ionen diese destabilisiert und für Fremd-DNA durchlässig.

50 ml dYT-Medium wurden mit einer Einzelkolonie der *E. coli*-Stämme JM 83 oder XL 1 beimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen überimpfte man 2 ml dieser Kultur in 100 ml dYT-Medium und ließ sie bis zu einer OD_{650} von 0,375 (mittlere log-Phase der Wachstumskurve, dauert etwa 2 bis 3 Stunden) anwachsen, um eine optimale Transformationskapazität zu erhalten. Die Zellen wurden dann bei 4 °C für 10 Minuten mit 1900 x g abzentrifugiert, anschließend in 15 ml TFB I aufgenommen und für 1 Stunde im Eisbad belassen. Nun folgte eine weitere Zentrifugation nach oben genannten Bedingungen. Die Zellen wurden dann in 2 ml TFB II aufgenommen und zu Aliquots von 50-100 µl in flüssigem Stickstoff schockartig gekühlt und bei –80 °C aufbewahrt.

3.4.3.2 Durchführung der Transformation

Ein Ansatz kompetenter Zellen (50-100 µl) wurde auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt, 15-30 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 90 Sekunden bei 43 °C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden 300 µl dYT-Medium hinzugefügt und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 5400 x g für 1 Minute. 200 µl Überstand wurden verworfen. Der Rest wurde resuspendiert und auf eine LB-Amp/X-Gal/IPTG-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Da das verwendete Plasmid ein Ampicillinresistenzgen trägt (amp^r -Gen), erfolgte die Selektion plasmidhaltiger Bakterien durch ampicillinhaltiges LB-Medium, während der Erfolg der Klonierung durch die Blau-Weiß-Selektion (3.4.3.3) überprüft werden konnte (doppeltes Selektionsprinzip).

3.4.3.3 Blau-Weiß-Selektion

Diese Selektion dient dazu festzustellen, ob ein Bakterienklon tatsächlich ein Plasmid mit der entsprechenden Insertions-DNA aufgenommen hat.

Der Klonierungsvektor pBluescript SK enthält das Gen für das α -Peptid der β -Galaktosidase (Lac Z), während JM 83-Zellen einen Defekt darin aufweisen. Durch die Aufnahme des Plasmids wird dieser Defekt kompensiert und die Bakterien können das Enzym bilden. Die Insertion von Fremd-DNA in das Plasmid bewirkt jedoch eine Zerstörung des „Lac Z-Gens“ und führt dazu, daß keine β -Galaktosidase gebildet werden kann.

Der Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgt durch eine Farbreaktion. Dabei wird das farblose X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) durch dieses Enzym in einen blauen Farbstoff umgesetzt. Folglich enthalten blaue Klone auf der dYT-Amp/X-Gal/IPTG-Agarplatte nur den Vektor, die weißen Klone enthalten aber das gewünschte rekombinierte Insert.

Nun wurden einzelne weiße Kolonien mit sterilen Zahnstochern in je 3 ml dYT/Amp-Medium überführt und nochmals bei 37 °C über Nacht im Schüttler (200 rpm) inkubiert.

3.4.4 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse (nach [9] modifiziert). Sie gleicht der Plasmid-Midi-Präparation (größere Plasmidmengen) aus 3.4.1.1 bis zur Verwendung der „QIAGEN-tip“. Anstattdessen wird bei der Minipräparation eine Phenol-Chloroformextraktion durchgeführt.

Etwa 1,8 ml der flüssigen Kultur aus 3.4.3.3 wurden 1 Minute bei 4300 x g abzentrifugiert, das Pellet wurde in 100 μ l Lösung 1 (Lysepuffer) resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 200 μ l Lösung 2 (Denaturierungspuffer), vorsichtiges Mischen und 5minütiges Kühlen auf Eis erfolgte der vollständige Zellaufschluß (Herauslösen der Proteine durch SDS) und die Denaturierung der chromosomalen DNA.

Weiterhin auf Eis wurden 150 μ l Lösung 3 (geköhlt) hinzugegeben, um Protein-K-SDS-Komplexe und chromosomale DNA auszufällen. Nach der Inkubation auf Eis für weitere 5 Minuten wurde das Präzipitat abzentrifugiert (5 Minuten bei ≥ 10000 x g), der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde einer einfachen Phenol-Chloroform-Extraktion (3.1.1) und anschließenden Äthanol-fällung (3.1.2) mit absolutem Äthanol unterzogen, und das

Pellet wurde in 100 µl 1 x TE/RNase aufgenommen und vor der Lagerung bei 4 °C nochmals für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

3.4.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Zur Mengen- und Reinheitsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA sowie zur Überprüfung der Größe des integrierten menschlichen DNA-Fragments wurde ein Restriktionsenzym-Verdau der DNA mit EcoR I und Hind III durchgeführt.

4 µl Plasmid-DNA wurden mit je 0,2 µl EcoR I und Hind III, 1 µl Puffer B (Boehringer) und 4 µl Aqua bidest. vermischt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 µl Auftragspuffer gestoppt und die verdaute Plasmid-DNA auf einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 2).

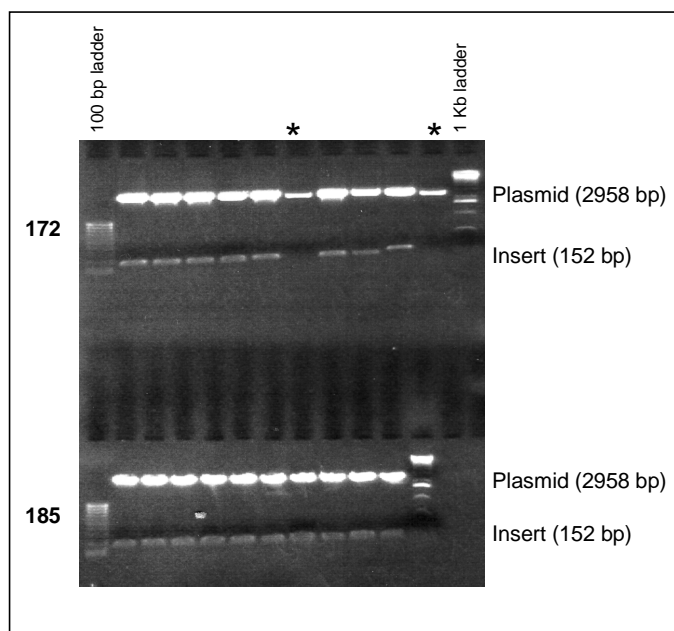


Abb. 2 Gelelektrophoretische Auftrennung des Restriktionsenzym-Verdau der Plasmid-DNA mit EcoR I und Hind III, * enthält kein Insert.

3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. Sie basiert auf der Tatsache, daß Nukleinsäuren bei neutralem pH an den Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen sind und so im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern.

Dabei geschieht die Auftrennung hauptsächlich nach der Größe der Fragmente, die Wanderungsgeschwindigkeit ist aber auch abhängig von der DNA-Konformation (3.6), der angelegten Spannung, der Gelkonzentration und dem verwendeten Laufpuffer.

Zur Abschätzung der Laufweite enthalten die Auftragspuffer eine Farbmarkierung aus Bromphenolblau und Xylencyanolblau.

3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose ist ein aus Seetang extrahiertes langkettiges Polysaccharid aus den sich wiederholenden Einheiten D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactose (Abb. 3). Die pulverförmige Agarose schmilzt beim Erhitzen in Elektrophorese-Puffer und geliert beim Abkühlen.

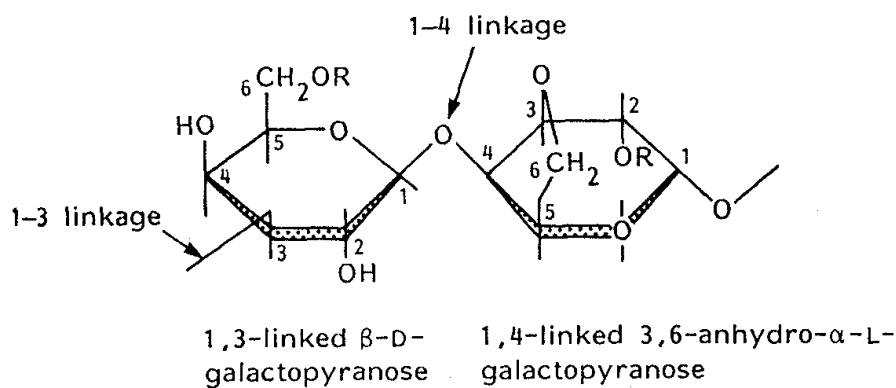


Abb. 3 Ausschnitt aus einer Agarosekette. Agarose ist linear und nicht quervernetzt.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt zur Überprüfung von PCR-Produkten und Restriktionsverdaus, zur Reinigung von PCR-Produkten vor Sequenzierungen und zur Austestung von Eluaten. Alle im Rahmen dieser Arbeit analysierten Fragmente konnten ausreichend in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt werden, so daß eine Konzentrationserhöhung für kleinere und -erniedrigung für größere Fragmente entfiel.

Zur Herstellung des Gels wurde ein Gemisch aus 1x TBE-Puffer und 1 % Agarose in benötigter Menge je nach Größe des Gelschlittens unter Rühren mit dem Magnetrührer durch kurzes Aufkochen aufgelöst. Nachdem der Magnetrührer entfernt wurde, pipettierte man 1 µl Ethidiumbromidlösung (1 %ig) pro 10 ml Agarosegel hinzu und überführte diese Lösung luftblasenfrei in einen vorbereiteten Gelschlitten (Ränder mit Tesafilm abgeklebt und Kamm positioniert).

Nach dem Abkühlen und Erstarren des Gels wurden die Tesafilm-Streifen sowie der Kamm entfernt und das Gel samt Schlitten in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer gelegt. Nun konnten 5, 10 oder 20 µl der zuvor mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer gemischten Proben aufgetragen werden. Als Längenstandards dienten die 100 bp Leiter (Invitrogen) oder die 1 Kb DNA-Leiter (Gibco BRL). Der Elektrophoreselauf wurde je nach Größe des Gels bei 75 bis 125 Volt durchgeführt.

Das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert im UV-Licht ($\lambda=302$ nm), so daß nach erfolgter Elektrophorese das Gel auf einem UV-Transilluminator betrachtet werden kann und die DNA-Fragmente als rot-orange leuchtende Banden sichtbar werden. Zur Dokumentation wurde das Gel mithilfe eines Bioprint-Systems fotografiert.

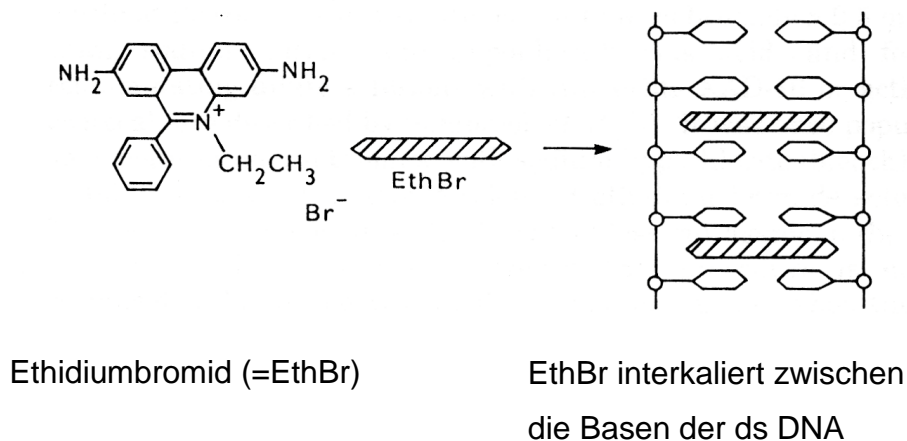


Abb. 4 Das in dem Agarose-Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der doppelsträngigen DNA und kann auf einem Transilluminator mit UV-Licht ($\lambda=302$ nm) betrachtet und mittels Bioprinter dokumentiert werden.

Fragmentgrößen der Längenstandards:

100 bp Leiter: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000.

1 kb DNA-Leiter (von der ersten deutlich sichtbaren Bande aus): 506/517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, darüber meist nicht genügend aufgetrennt.

3.5.1.1 DNA-Aufbereitung aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), das sogenannte „QIAquick spin“-Säulen mit einer Silica-Gel-Membran enthält, welche die DNA in einem pH-Bereich $\leq 7,5$ bei hoher Salzkonzentration zuverlässig adsorbiert und bei niedriger Salzkonzentration und einem pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5 wieder eluiert

Dazu wurden 20 μ l des aufzureinigenden PCR-Produktes in einem Agarosegel zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde dann unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten und gewogen. In einem Reaktionsgefäß wurde das Gelstückchen in dem dreifachen Gelvolumen ($100 \text{ mg} \triangleq 100 \mu\text{l}$) Puffer QG im Wasserbad (50°C , 10 Minuten) gelöst. Danach sollte sich die Farbe des Puffers, der einen pH-Indikator enthält, nicht rot verfärbt haben. Anschließend wurde das einfache Gelvolumen Isopropanol hinzugegeben, um den Ertrag von DNA-Fragmenten $< 500 \text{ bp}$ zu optimieren. Dieser Ansatz wurde dann in eine „QIAquick spin“-Säule, die in einem Sammelgefäß plziert war, überführt und für 1 Minute zentrifugiert (bei $\geq 10000 \times g$), um die DNA an die Silica-Gel-Membran zu adsorbieren. Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, Nukleotide, Agarose, Farbstoffe, Ethidiumbromid, Öle u. a. wurden in diesem Schritt filtriert und anschließend verworfen. Um Reste von Agarose zu entfernen, wurde die Membran gespült durch Hinzufügen von 0,5 ml Puffer QG und Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Ein zusätzlicher Waschvorgang mit 0,75 ml Puffer PE (äthanolhaltig) entfernte verbliebene Salzreste. Nachdem das Filtrat verworfen wurde, mußte die „QIAquick spin“-Säule noch einmal unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert werden, um den Puffer vollständig zu entfernen, der nachfolgende enzymatische Reaktionen (z. B. zyklische Sequenzierung, Ligation) stören könnte.

Nun wurde die „QIAquick spin“-Säule in ein sauberes Reaktionsgefäß plaziert und die DNA wurde durch Hinzufügen von 50 µl Aqua bidest. (pH zwischen 7,0 und 8,5) eluiert. So erhielt man durchschnittlich 48 µl wäßrige DNA-Lösung mit maximal 10 µg DNA.

Anschließend wurden 4 µl des Eluats auf ein Agarosegel mit kleinem Kamm aufgetragen, um die Extraktion zu überprüfen und die Konzentration der DNA abzuschätzen.

Das so aufgereinigte PCR-Produkt konnte dann zur Sequenzierung oder Ligation eingesetzt werden.

3.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgele zeichnen sich gegenüber den Agarosegelen durch kleinere Porengröße und ein schärferes Auftrennungsvermögen aus und eignen sich für DNA-Fragmente im Größenbereich von ca. 5-1000 bp.

Das Polymer wird hergestellt aus den Verbindungen Acrylamid und N', N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 19:1, sowie N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS). APS, welches 10 %ig in Wasser gelöst ist, bildet freie Radikale und dient als Starter für die radikalische Polymerisation des Acrylamids. TEMED dient als Katalysator. Durch die Anwesenheit von N', N'-Methylenbisacrylamid werden die linearen Acrylamidketten zu einem dreidimensionalen Netz verbunden. Die Porengröße kann durch die Veränderung der Konzentrationen sowohl des Acrylamids als auch des N'-N'-Methylenbisacrylamids variiert werden [66], wodurch der Trennbereich für unterschiedliche Fragmentlängen optimiert werden kann.

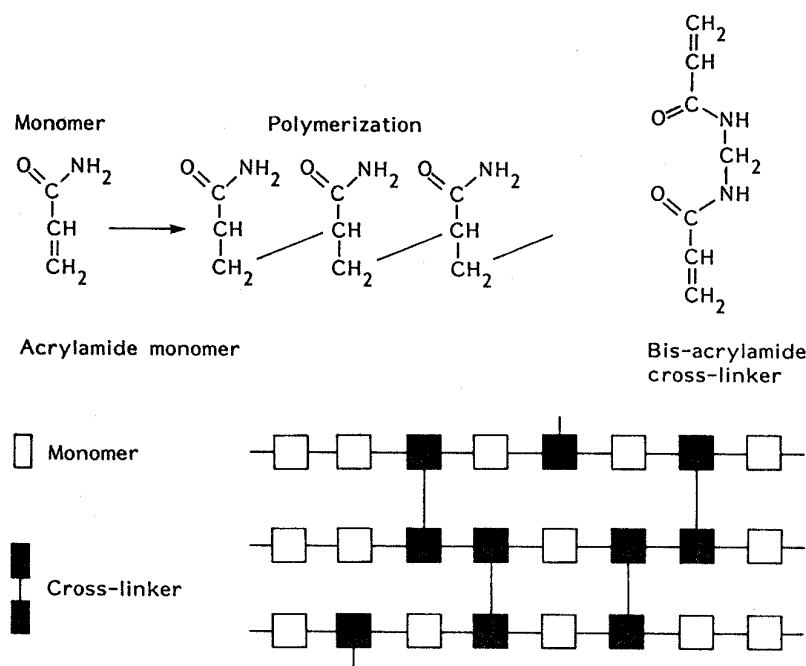


Abb. 5 Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid-Quervernetzer in Anwesenheit von APS und TEMED.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Polyacrylamidgele eingesetzt für „Single Strand Conformation Polymorphism“ Analysen (SSCP), DNA-Sequenzierungen und „Short Tandem Repeat“ Untersuchungen (STR), wobei sich die Gelmatrix je nach Verwendungszweck in Konzentration und Eigenschaften unterscheidet.

Zur Vorbereitung des Gelgießens wurden die Glasplatten (42 cm x 33 cm und 39 cm x 33 cm) gründlich mit Haemo-Sol (Dade AG, Düdingen) sowie destilliertem Wasser gereinigt und dabei die Beschichtung der Platten durch die Oberflächenspannung des Wassers beurteilt. Anschließend erfolgte die nochmalige Reinigung mit Äthanol. Unter dem Abzug wurde dann die kleinere der beiden Platten jedesmal mit Acrylease (Stratagene) und die größere nur bei Bedarf mit Sigmacote (Sigma) silikonisiert, um später das Ablösen des Gels von den Platten zu erleichtern.

Die verwendeten „Spacer“ als Abstandhalter zwischen den zwei Platten hatten eine Dicke von 0,4 mm, zusätzlich wurden die Ecken mit Silikon-Fett abgedichtet. Mit Stahlklammern wurden beide Platten mit den dazwischen befindlichen „Spacern“ aufeinander fixiert.

Es wurden je etwa 75 ml einer Polyacrylamid-Lösung in einem Erlenmeyer-Kolben vorbereitet. (6 % oder 8 % Acrylamid-Stammlösungen (2.5) wurden im Kühlschrank aufbewahrt.)

0,5 x MDE-Gel: 18,75 ml MDE (2x)
 4,5 ml 10 x TBE (\Rightarrow ca. 0,6 x TBE)
 51,75 ml Aqua bidest.

0,5 x Serdogel: 20 ml Serdogel (2x)
 4,8 ml 10 x TBE (\Rightarrow ca. 0,6 x TBE)
 55,2 ml Aqua bidest.

Dann wurde durch Zugabe von 400 μ l Ammoniumpersulfat und 30 μ l TEMED die Polymerisation gestartet. Mit einer Glaspipette wurde das Gel blasenfrei gegossen und anschließend mit der glatten Seite eines Kamms eine gerade Kante gesteckt. Nach etwa einer Stunde war das Gel polymerisiert.

Vor der Elektrophorese wurde der Kamm gezogen und der Spalt gereinigt. Nach dem Einspannen der Gelplatten in die vertikale Elektrophoresekammer wurden die obere und untere Pufferkammer mit dem entsprechenden Laufpuffer gefüllt, der Spalt luftblasenfrei ausgespült und außer bei den SSCPs ein Vorlauf des Gels zum Aufwärmen gestartet. Vor dem Auftragen der Proben wurde der Spalt nochmals ausgespült und der Kamm so gesteckt, daß Auftragstaschen entstanden. Daraufhin konnten jeweils 3 μ l der mit Stopppuffer versehenen und denaturierten Proben aufgetragen werden.

Nach der Elektrophorese (Bedingungen siehe 3.6, 3.7, 3.8) wurden denaturierende Gele zunächst in 10 %igem Eisessig fixiert, SSCPs wurden sofort auf ein Gel-Blotting-Papier überführt und auf einem Geltrockner unter Vakuum bei 80 °C getrocknet.

3.5.2.1 Autoradiographie

Die Autoradiographie ist eine Methode, bei der Radionukleotide über Filmschwärzung zur Darstellung kommen.

Die nach der Elektrophorese auf Filterpapier getrockneten Polyacrylamidgele wurden in direkten Kontakt mit dem Filmmaterial gebracht. Die auf den Film einfallende radioaktive Strahlung führte dann über Ionisationsprozesse und Freisetzung von Elektronen zu einer Reduktion von Silberionen zu atomarem Silber (schwarz). Je nach Radioaktivität betrug die „Belichtungszeit“ wenige Stunden bis mehrere Tage.

Zur Filmentwicklung wurden die Filme unter Rotlicht etwa eine Minute in Entwicklerlösung gelegt, kurz in Wasser gespült und anschließend in Fixierlösung so lange geschwenkt, bis sie durchsichtig wurden. Danach wurden die Filme gründlich mit Wasser gereinigt und zum Trocknen aufgehängt.

Herstellung der Lösungen (Fa. Sterling Diagnostic Imaging):

Entwicklerlösung: 625 ml Lösung A, 125 ml Lösung B, ad 2500 ml Aqua bidest.

Fixierlösung: 625 ml Lösung A, 62,5 ml Lösung B, 125 ml Lösung C, ad 2500 ml Aqua bidest.

3.6 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Die SSCP ist eine 1989 entwickelte Methode der Gelelektrophorese, mit der sich Mutationen nachweisen, aber nicht beschreiben lassen [91]. Es werden die denaturierten und dadurch einzelsträngigen DNA-Kopien einer Elektrophorese im nichtdenaturierenden Gel unterworfen. Dabei werden die Polynukleotide in einer Gelmatrix je nach Größe, Ladung und Form elektrophoretisch unterschiedlich aufgetrennt.

Unter nichtdenaturierenden, nativen Bedingungen ist der DNA-Einzelstrang gefaltet. Diese Faltung beruht auf intramolekularen Basenpaarungen, die durch die Sequenz vorgegeben sind. Ändert sich die Sequenz, d. h. die Primärstruktur, z. B. wegen einer Punktmutation, Insertion oder Deletion einzelner Basen, so verändert sich bereits auch die Tertiärstruktur des Einzelstranges (Konformation). Diese Konformationsänderung kann zu unterschiedlichem Laufverhalten in der Elektrophorese führen und dann als Mutation erkannt werden. Für die SSCP-Analyse sind gleichbleibende Bedingungen während der gesamten Elektrophorese besonders wichtig, da die Konformation des DNA-Einzelstranges von der Temperatur und der Ionen- und Lösungsmittelkonzentration abhängt.

Für eine SSCP wurden die PCR-Produkte aus einer radioaktiven PCR („Heiß-PCR“) wie dort beschrieben mit Stoppuffer versehen, auf 94 °C für 3 Minuten erhitzt und auf Eis gekühlt. Bis zum Auftrag auf dem Gel verblieben die Proben bei –20 °C.

Um möglichst gleichbleibende Temperaturen zu gewähren, wurde die Elektrophorese mit konstanter Spannung von 450-500 Volt im Kühlraum bei +4 °C auf vertikalen Elektrophoresekammern mit wärmeableitenden Metallplatten durchgeführt. Um die Sensitivität zu

erhöhen, erfolgte jeweils ein weiterer Lauf bei Raumtemperatur und einer Spannung von 600-650 Volt. Die Elektrophorese wurde jeweils beendet, wenn sich das Xylencyanolblau im unteren Viertel des Gels befand (bei +4 °C ca. 20-24 Stunden, bei Raumtemperatur ca. 8-10 Stunden).

Da auch die Eigenschaft der Gelmatrix die Wahrscheinlichkeit, Mutationen zu detektieren, erhöht [66], wurden die kommerziellen modifizierten Polyacrylamid-Lösungen MDE (Mutation Detection Enhancement)-Gel und Serdogel verwendet.

Die Detektionsrate dieser Mutationssuchmethode hängt von der Größe des Amplikons ab. Sarkar et al. [100] erzielten bei einem 187 bp großen Fragment eine Sensitivität von 75-92 %, während bei einer Fragmentgröße von 307 bp nur noch eine Sensitivität von 50-63 % bestand. Hayashi und Yandell (1993) schlagen jedoch vor, bei Fragmenten <200 bp eine Detektionsrate von >90 % anzunehmen [40].

3.7 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode (Sanger)

Die Sequenzierung von DNA nach der 1977 von Sanger et al. [101] entwickelten Didesoxymethode beruht auf einem zufälligen Abbruch der Sequenzierungsreaktion durch den Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP). Diesen ddNTPs fehlt die 3'-OH-Gruppe, so daß die weitere Polymerisation verhindert wird (Kettenabbruch). Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die alle mit derselben Base enden. Verwendet man alle vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) kann man nach Auftrennung mit einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Sequenz ablesen (siehe Kapitel 5).

Die DNA, deren Basenfolge bestimmt werden soll, kann einzel- oder doppelsträngig vorliegen. Letztere muß jedoch immer vor der Sequenzierung denaturiert werden.

In den meisten Fällen genügte es für diese Dissertationsarbeit, DNA aus PCR-Produkten zu sequenzieren. Da so die Menge der „Template“-DNA relativ gering war, wurde eine zyklische Sequenzierung („cycle sequencing“) durchgeführt (3.7.1), bei der durch wiederholte Zyklen von Denaturierung, Primeranlagerung und Kettenverlängerung wie bei einer üblichen PCR, jedoch mit nur einem einzigen radioaktiv markiertem Primer (γ -³²PdATP), eine lineare Amplifizierung stattfindet.

Eine direkte (T7-) Sequenzierung (3.7.2), bei der im Gegensatz zur zyklischen Sequenzierung ein einzelnes Chromosom beurteilt und durch Verwendung anderer Radioaktivität die

Sequenz deutlicher gelesen werden kann, wurde durchgeführt, wenn eine Mutation bei der zyklischen Sequenzierung nur in einer Richtung eindeutig nachgewiesen werden konnte, oder wenn herausgefunden werden sollte, ob zwei nebeneinander liegende Mutationen nur auf einem oder auf beiden Chromosomen liegen. Bei dieser Methode mußte so viel „Template“ vorhanden sein, daß eine einmalige Primeranlagerung an einen Strang (entweder T3 oder T7) mit anschließender Markierungsreaktion (α - $^{35}\text{SdATP}$) und Kettenabbruchreaktion ausreichte, um die Sequenz des einzelnen Stranges in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie darstellen zu können. Die ausreichende Menge an „Template“ inklusive der Anlagerungsstellen für die Primer T3 und T7 (Pharmacia) erhielt man durch Klonierung des PCR-Produktes im Vektor pBluescript SK (3.4, Abb. 1). Die daraus extrahierte Plasmid-DNA wurde dann denaturiert und direkt sequenziert.

3.7.1 Zyklische Sequenzierung („Cycle Sequencing“)

Zur Vorbereitung des „Template“ wurden 20 μl PCR-Produkt über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt, die Bande wurde über einem UV-Transilluminator ausgeschnitten, und die DNA wurde mittels des QIAquick Gel Extraction Kits eluiert. (3.5.1.1) Anschließend wurden 4 μl des Eluats auf einem kleinen Agarosegel ausgetestet, um die Menge an „Template“-DNA, die für die Sequenzierung eingesetzt werden sollte, abzuschätzen.

Außerdem wurden die Primer - jeweils A und B getrennt - vor der Sequenzierung mit γ - $^{32}\text{PdATP}$ radioaktiv end-markiert.

Ansatz für ^{32}P End-Markierung mit der T4 Polynukleotidkinase von USB (auf Eis):

1 μl	Primer (=15 pmol)
1 μl	10x T4 PNK Puffer
2 μl	T4 Polynukleotidkinase (1:10 verd. mit Kinase-Verdünnungspuffer)
2 μl	γ - $^{32}\text{PdATP}$
4 μl	Aqua bidest.

Dieser Ansatz wurde dann für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt. Lagerung bis zur Sequenzierung erfolgte bei –20 °C.

Die eigentliche zyklische Sequenzierung wurde mithilfe des Thermo Sequenase cycle sequencing kits (Amersham) durchgeführt. Pro „Template“ wurden je 4 µl „Termination Mix“ A, C, G oder T zweifach (A und B Primer) in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Je „Template“ und Primer wurde dann folgender „Mastermix“ auf Eis angesetzt:

„Mastermix“: 12,5 µl „Template“-DNA (bei weniger DNA mit Aqua bidest. auffüllen)

2 µl Reaktionspuffer

1 µl ³²P end-markierter Primer (=1 pmol)

2 µl Thermo Sequenase DNA Polymerase

In die mit „Termination Mix“ A, C, G und T vorgelegten Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden dann je 4 µl des „Mastermixes“ überführt, durch Auf- und Abpipettieren wurde vorsichtig gemischt (Kontaminationsgefahr!), und mit je 1 Tropfen Mineralöl wurden die Ansätze überschichtet.

Daraufhin wurde in dem DNA Thermal Cycler der Fa. Perkin Elmer Cetus ein Programm gestartet, das dem der zu den Primern gehörigen PCR entsprach (2.6), jedoch mit einer Denaturierungstemperatur von 95 °C und ohne eine „final extension“. Jeder Ansatz wurde nach Ablauf des Programms mit 4 µl Stoppuffer gemischt, noch einmal für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert, anschließend auf Eis gekühlt und bis zum Auftrag auf ein denaturierendes 8 %iges Polyacrylamidgel bei –20 °C gelagert.

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur mit 60 Watt in zwei verschiedenen Aufträgen durchgeführt, wobei der erste Auftrag insgesamt zweimal und der zweite Auftrag einmal die Strecke des Bromphenolblaus zurücklegen sollte (ca. 3,5 Stunden).

3.7.2 Direkte Sequenzierung (T7-Sequenzierung)

Diese Form der Sequenzierung wurde nur für Plasmid-DNA angewandt und mit dem T7-Sequencing Kit der Firma Pharmacia durchgeführt.

Für jeden Sequenzierungsansatz wurde zunächst die Plasmid-DNA aus 50 µl „Minipräp“ (aus 3.4.4, entsprechen 2-6 µg Plasmid-DNA) mit Äthanol / 0,15 M Natriumacetat, pH 5,2 gefällt, mit Äthanol (70 %) gewaschen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

Die gefällte DNA wurde nun zur Denaturierung mit 40 µl 0,2 M NaOH / 0,2 M EDTA für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 4 µl 2 M Ammoniumacetat und 100

μl Äthanol (100 %) neutralisiert. Die gleichzeitig präzipitierte DNA wurde durch 15minütige Zentrifugation pelletiert, dann noch zweimal mit Äthanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in 10 μl Aqua bidest. aufgenommen.

Als Oligonukleotide fanden die T3- und T7-Primer Anwendung, abgeleitet aus den Bakteriophagenpromotorregionen (siehe Abb. 1). Zur Primeranlagerung wurde die denaturierte DNA aus vorherigem Schritt zusammen mit 2 μl Primer (T3 oder T7 aus Kit) und 2 μl Anlagerungspuffer für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt.

Zur radioaktiven Markierung wurde entsprechend der Probenzahl n aus vorherigem Schritt der nachfolgend aufgeführte Enzym-Premix auf Eis hergestellt.

Enzym-Premix: n μl Aqua bidest.

3n μl Labelling Mix (dATP)

2n μl T7 DNA Polymerase (verd. mit Enzym-Verd.-Puffer auf 1,5 U/ μl)

n μl α -³⁵SdATP (= 10 μCi)

Jeweils 4,5 μl des Enzym-„Premix“ wurden zu den Annealing-Ansätzen pipettiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Das radioaktive Nukleotid α -³⁵SdATP wurde in diesem Reaktionsschritt entsprechend der Basenfolge (siehe Abb. 1) an die Primer polymerisiert und ermöglichte so die an die Sequenzierung und Elektrophorese anschließende Autoradiographie.

Die Sequenzierungsreaktion nach der Kettenabbruchmethode erfolgte bei 37 °C in vier getrennten Ansätzen pro Markierungsansatz. Zu den Eppendorfgefäßen mit entsprechenden Didesoxynukleotidmischen A, C, G oder T (je 2,5 μl , auf 37 °C vorgewärmt) wurden je 4,5 μl des Markierungsansatzes pipettiert. Nach 5 Minuten wurde die Sequenzierungs- bzw. Kettenabbruchreaktion durch Zugabe von 5 μl „Stop Solution“ unterbrochen, und die Ansätze wurden bei -20 °C gelagert.

Unmittelbar vor dem Gelauftrag auf ein 6 %iges Polyacrylamidgel wurden die Proben noch einmal für 2 Minuten bei 85 °C erhitzt. Im Gegensatz zu allen anderen radioaktiven Elektrophoresen, bei denen jeweils 3 μl aufgetragen wurden, wurden nur je 2 μl der Proben aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde nach den in 3.7.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

3.8 Short Tandem Repeat Polymorphism Analysen (STRP)

STRPs, auch Mikrosatelliten-Marker genannt, bestehen aus einer kurzen, sich mehrfach wiederholenden Sequenz von einem bis zu vier Nukleotiden. Sie werden oft durch mehrere Allele charakterisiert, je nach dem wie häufig die repetitive Sequenz vorkommt.

Durch die diese Regionen flankierenden Primer werden die STRPs mithilfe einer radioaktiv markierten PCR (3.3.5) amplifiziert. Diese Produkte werden über ein 6 %iges Polyacrylamidgel bei 60 Watt aufgetrennt werden.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden STRPs für den Nachweis der Vaterschaft verwendet. Die polymorphen Marker sind in Tab. 3-3 in Kapitel 3.3.3 zu finden.

4 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 36 Patienten aus 24 Familien molekulargenetisch untersucht. Die klinischen Angaben entstammen zum Teil den ausführlichen Untersuchungen von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. Müller und Frau Dr. D. Steinberger, Institut für Humangenetik des Klinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen (4.1), zum Teil aber auch von den die Patienten betreuenden Hausärzten, Kinderärzten oder Neurologen (4.2).

Die in Kapitel 4 und 5 abgebildeten Stammbäume sind wie folgt zu interpretieren:



4.1 Anamnese und Befund durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. Müller und Frau Dr. D. Steinberger

Im Rahmen dieser Studie wurden von der Arbeitsgruppe 64 Familienmitglieder aus elf Familien klinisch untersucht, insbesondere im Hinblick auf das Vorliegen diskreter DRD-Symptomatik.

Dabei wurde ein einfacher Test durchgeführt (Schreibtest): Bei Innervation der nicht dominierenden Hand (zum Beispiel durch einfache Schreibaufgaben), treten bei Vorliegen einer dystonen Bewegungsstörung häufig dystone Haltungen oder Mitbewegungen der kontralateralen Hand oder der unteren Extremität auf [111].

Siehe auch Kapitel 4.3.

4.1.1 FAMILIE 1

Patient III/2 war der Indexpatient dieser Familie. Er erlernte erst spät das Laufen und konnte im Alter von 4 Jahren nach einigen Schritten nur noch mit Unterstützung gehen.

Morgens ging es dem Jungen noch viel besser als im Laufe des Tages. Mit 12 Jahren wurde bei ihm die Diagnose DRD gestellt. Unter 100 mg L-Dopa kann der Patient alle körperlichen Tätigkeiten selbständig verrichten und ist bis auf Genua valga und Fußsohlenaußenkantenbelastung weitgehend asymptomatisch.

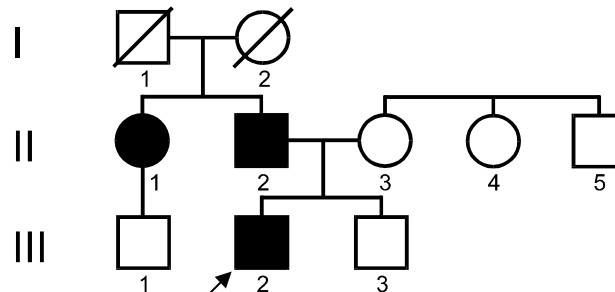


Abb. 4-1 Stammbaum der FAMILIE 1. Der Pfeil markiert den Indexpatienten.

Seine Tante (II/1) litt seit dem 6. Lebensjahr unter dystonen Bewegungsstörungen. Zunächst zog sie das rechte Bein nach. Hinzu kam eine Spitzfußstellung beidseits, so daß im Alter von 14 Jahren eine beidseitige Achillotomie durchgeführt wurde. Mit temporärer Rollstuhlpflicht, der Außenrotation des linken Arms, einem Torticollis nach links, oromandibulärer Dystonie mit zeitweiliger Unfähigkeit zu sprechen und ausgeprägten tageszeitlichen Schwankungen bot sie ein besonders klassisches Bild der Dopa-responsiven Dystonie. Die Diagnose wurde allerdings erst nach Diagnosestellung ihres Neffen im Alter von 49 Jahren gestellt. Auf L-Dopa (150 mg) trat zunächst drastische Besserung ein, nach vierjähriger Behandlung verschlechterte sich die Motorik jedoch wieder.

Ihr Sohn (III/1) hatte im Alter von 18 Jahren Schmerzen im LWS-Bereich, die sich nach Krankengymnastik jedoch besserten. Die Beweglichkeit der Wirbelsäule war eingeschränkt. Er zeigte aber keine weiteren für die DRD typische Symptome.

Bei dem Vater (II/2) des Indexpatienten bestand seit dem 4. Lebensjahr eine Supinations- und Spitzfußstellung. Wie seine Schwester wurde auch er achillotomiert, hatte aber außerdem keine weiteren Symptome, so daß er zum Zeitpunkt der Untersuchung keiner Behandlung bedurfte.

Die Großmutter (I/2) starb mit 78 Jahren an einem Herzinfarkt, der Großvater (I/1) mit 29 Jahren im Krieg. DRD-Symptome waren bei ihnen nicht bekannt.

4.1.2 FAMILIE 2

Die Indexpatientin dieser Familie (III/1) litt an einer besonders schweren Form der DRD [56]. Bereits beim Laufenlernen ab einem Alter von etwa 1 Jahr fiel eine Spitzfußstellung auf. Wegen zusätzlichen häufigen Stürzens wurde Krankengymnastik veranlaßt, die die Symptomatik eher verstärkte. Die Erkrankung unterlag tageszeitlichen Schwankungen, verlief progredient und führte im Alter von 5 Jahren zur Rollstuhlpflicht. Mit 9 Jahren erhielt sie L-Dopa als Therapie, auf das sie ungewöhnlich langsam reagierte. Erst nach einer Behandlung von 12 bis 14 Monaten konnte sie wieder laufen. Im Alter von 20 Jahren hatte sie zum Zeitpunkt der Untersuchung unter 250 mg Levodopa außer einem etwas flapsigen Gang bei normaler Fußstellung keine Symptome. Jedoch neigte sie zu choreatischen Hyperkinesen bei noch höherer Dosierung, und stellt damit eine Ausnahme der im allgemeinen angenommenen nebenwirkungsfreien Gabe von L-Dopa bei DRD-Patienten dar [56, 83].

Ihre Mutter II/2 und Großmutter I/1, die beide schwere körperliche Arbeiten ausübten, haben bis auf Bandscheibendegeneration bzw. Gonarthrose keine Symptome des Bewegungsapparates. Der Vater II/1 ist gesund.

Der Stammbaum dieser Familie ist im Zusammenhang mit der SSCP-Untersuchung in Kapitel 5.1.3 abgebildet.

4.1.3 FAMILIE 3

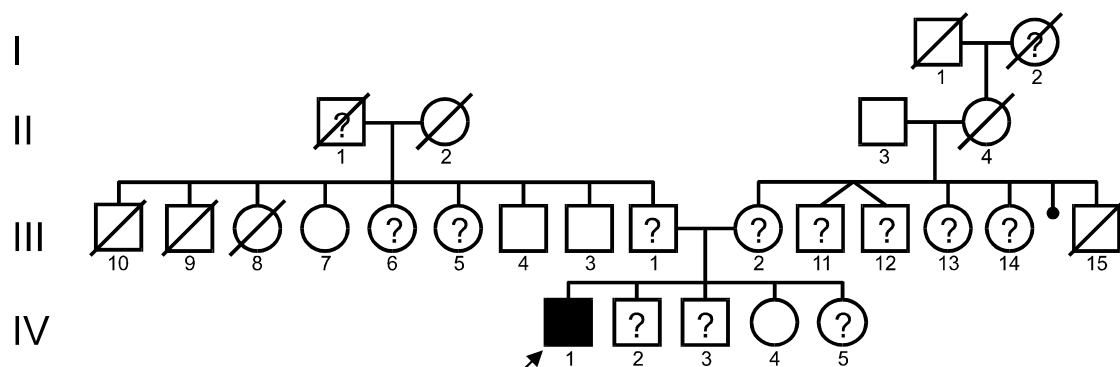


Abb. 4-2 Stammbaum der FAMILIE 3. Der Pfeil markiert den Indexpatienten.

Bei dem Indexpatienten dieser Familie (IV/1) (siehe [59] Patient 3) fiel im Alter von 12 Jahren das erste Mal auf, daß er das linke Bein nachzog. Ein Orthopäde stellte daraufhin eine linksseitige Beinlängenverkürzung sowie eine Skoliose fest. Innerhalb weniger Monate dehnte sich die Bewegungsstörung auf seinen linken Arm mit Kraftminderung sowie auf den oromandibulären Bereich aus, so daß er den Mund nicht mehr schließen konnte und auch sprachliche Auffälligkeiten zeigte. Zunächst konnte eine psychogene Störung bei dem sehr empfindlich wirkenden Jungen nicht ausgeschlossen werden. Wegen zunehmender Seitendifferenz der Muskeleigenreflexe wurde dann jedoch ein organisches Leiden angenommen und ein Therapieversuch mit L-Dopa eingeleitet, der in einer baldigen Besserung der oromandibulären Dyskinesien und einem verzögerten aber deutlichem Ansprechen der Halbseitensymptomatik resultierte. Zum Zeitpunkt der Untersuchung trug der Patient noch immer ein Korsett sowie eine Schuherhöhung, paßte die Dosis seiner Belastung an und lag mit durchschnittlichen 400 mg L-Dopa täglich eher im oberen Bereich der für die DRD typischen Dosierung. Auch unter dieser Dosierung zeigte er beim Schreiben deutliche dystone Zeichen, gab aber an, bei höherer Dosierung unter Muskelzuckungen im linken Arm zu leiden.

Die beiden Brüder des Indexpatienten (IV/2 und IV/3) zeigten dystone Haltungen der rechten Hand beim Schreiben mit der linken, eine Schwester bandagierte nachts beide Füße wegen dorsalextendierter Großzehen.

Der Vater der Geschwister (III/1) hatte im 40. Lebensjahr plötzlich Schwierigkeiten beim Laufen und zog das rechte Bein nach. Wegen gleichzeitiger Parästhesien ist dabei wohl eher an eine Nervenschädigung zu denken. Auch zum Zeitpunkt der Untersuchung wurde das Bein noch immer nachgezogen, es fand sich allerdings keine Innenrotations- oder Supinationsstellung des Beines. Beim Schreibtest mit links flektierte der Daumen der rechten Hand. Dieser Schreibtest zeigte auch bei dessen Schwester (III/6) diskrete dystone Haltungen. Eine weitere Schwester (III/5) wurde wegen eines Hallux valgus orthopädisch behandelt. Bei den anderen Geschwistern sind keine dystonen Pathologica bekannt.

Der Großvater väterlicherseits (II/1) habe im Alter auch einen offenstehenden Mund und eine Bewegungsstörung im linken Arm gehabt.

Eine ebenso auffällige Dystonie-Symptomatik fand sich in der mütterlichen Verwandtschaft. Bei der Mutter des Indexpatienten (III/2) fielen leicht supinierte Füße auf. Sie klagte über typische Spreizfußsymptomatik mit morgendlichen Schmerzen beim Barfußlaufen. Der Schreibtest war bei ihr sowie einer Schwester (III/13) und einem Bruder (III/11) diskret bis deutlich pathologisch. Von einem Sohn des letzteren wurde berichtet,

daß bei ihm eine Beinlängenverkürzung bestand und er über viele Jahre hinweg orthopädische Schienen trug. Eine andere Schwester (III/14) wurde bei bekannten Senk-Spreizfüßen beidseitig wegen Halluces valgi operiert, und ein weiterer Bruder (III/12) trug wegen Spreizfüßen Einlagen. Ein im Säuglingsalter verstorbener Bruder litt unter „Krämpfen“. Von der Großmutter dieser fünf Geschwister wurde berichtet, daß sie einen „nach innen laufenden“ Gang gehabt habe.

4.1.4 FAMILIE 4

Patientin III/2 ist die Indexpatientin dieser Familie (siehe [59] Patient 1). Im Alter von 3 Jahren beginnende progrediente Gangunsicherheit mit Adduktion und Pronation der Füße. Sie konnte nur auf Zehenspitzen mit Unterstützung gehen. Später kamen Schwäche und Muskelanspannung in den Armen und Händen hinzu. Im Verlauf des Tages war sie zunehmend erschöpft, es entwickelte sich eine beinbetonte Tetraplegie. Mit 9 Jahren wurde eine Achillessehnen-Tenotomie durchgeführt, ab ihrem 12. Lebensjahr war sie auf einen Rollstuhl angewiesen. Mit 24 Jahren erhielt sie erstmals L-Dopa und konnte daraufhin wieder laufen. Nach 2-3 Jahren stellte sich bei ihr allerdings ein Wirkungsverlust ein, und bei höherer Dosierung zeigte sie hyperkinetische Symptomatik, so daß sie zum Zeitpunkt der Untersuchung bei einer täglichen L-Dopa-Dosierung von 280 mg wieder einen Rollstuhl verwendete, aber mit Unterstützung laufen konnte.

Bei ihrer Tochter (Patientin IV/1, siehe [59] Patient 2) wurde seit dem 16. Lebensmonat beobachtet, daß sie häufig hinfiel, nicht altersgerecht lief und ihre Füße innenrotiert waren. Tageszeitliche Schwankungen fielen im Alter von 6 Jahren auf. Ab ihrem 7. Lebensjahr trat nach L-Dopa-Gabe Besserung ein. Bei täglicher Einnahme von 125 mg L-Dopa war sie zum Zeitpunkt der Untersuchung beschwerdefrei.

Eine Schwester der Indexpatientin (Patientin III/6) „schlackert“ seit ihrer Kindheit mit dem linken Bein, welches verkürzt und innenrotiert ist. Die Symptomatik wird verstärkt durch Anstrengung und Alkoholgenuß. Beim Schreibtest mit der linken Hand, wurden dystone Verkrampfungen der rechten Hand beobachtet. Sie nahm zum Zeitpunkt der Untersuchung kein L-Dopa ein.

Ein Bruder der Indexpatientin (Patient III/3) litt unter Rückenbeschwerden. Außerdem habe ein Arzt eine Beinlängenverkürzung festgestellt. Eine weitere Schwester (III/5) war

klinisch asymptomatisch und ein weiterer Bruder (III/7) konnte leider weder klinisch noch molekulargenetisch untersucht werden.

Die Eltern dieser fünf Geschwister (II/1 und II/2) wiesen keine Dystoniezeichen auf. Allerdings habe die Großmutter mütterlicherseits (I/2), die im Alter von 26 Jahren an einer Infektion verstarb, ebenso wie die Patientin III/6 einen „schlackernden Fuß“ und ein innen-rotiertes Bein gehabt, so daß anzunehmen ist, daß auch sie betroffen war.

Der Stammbaum dieser Familie ist im Zusammenhang mit der SSCP-Untersuchung in Kapitel 5.1.2 abgebildet.

4.1.5 FAMILIE 5

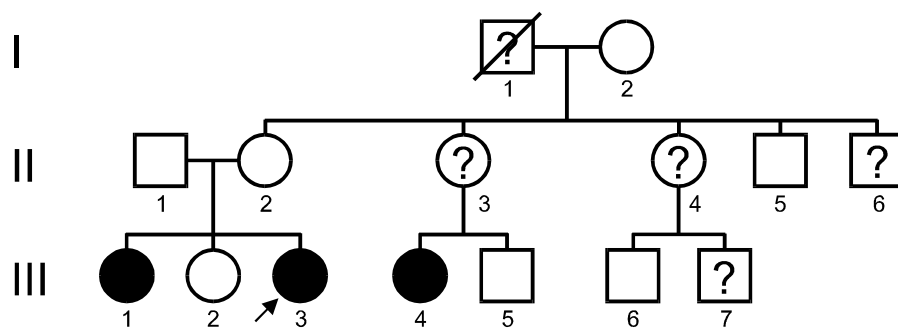


Abb. 4-3 Stammbaum der FAMILIE 5. Der Pfeil markiert die Indexpatientin.

Die Indexpatientin dieser Familie (III/3) fiel erstmals im Alter von 4 Jahren mit Zehenspitzenengang und supinierten Füßen sowie Anstrengungstremor auf. Morgens waren diese Symptome nur gering ausgeprägt oder gar nicht vorhanden. Außerdem habe sie einen sehr unruhigen Schlaf. Zum Zeitpunkt der Untersuchung erhielt das damals 5jährige Mädchen gerade seit drei Tagen L-Dopa. Der Gang war noch immer auffällig, jedoch war nur eine minimale Supinationsstellung der Füße zu erkennen. Nach Berichten der Eltern schlief die Patientin seit der Medikamenteneinnahme sehr viel ruhiger.

Ihre sechs Jahre ältere Schwester (III/1) hatte mit 6 Jahren Beugekontrakturen aller Zehen bis hin zu totaler Supinationshaltung der Füße. Zusätzlich zur medikamentösen Therapie war Krankengymnastik notwendig, um die Kontrakturen zu beheben. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war das damals 11jährige Mädchen unter 250 mg L-Dopa asymptomatisch, es gab aber an, daß die Füße gegen Mittag supiniert seien, wenn die Tabletten vergessen worden waren.

Die Cousine der Mädchen (III/4) wurde im Alter von 5 Jahren mit einem Torticollis nach rechts auffällig, der operiert wurde. Es kamen Supination des rechten Fußes, Tremor am gesamten Körper sowie eine stark gebeugte Körperhaltung hinzu. Diese Symptome unterlagen tageszeitlichen Schwankungen, begannen etwa ein bis zwei Stunden nach dem Aufstehen und behinderten sie so sehr, daß sie fast einen Rollstuhl benötigte. Seit der Therapie mit 100 mg L-Dopa zeigte die zum Zeitpunkt der Untersuchung 14jährige Patientin außer beim Schreibtest keine dystonen Symptome.

Deren Mutter (II/3), bei der bisher keine DRD diagnostiziert wurde, gab an, daß sie häufig über ihren rechten supinierten Fuß stolperte. Ihre rechte Großzehe war in leichter Beugestellung fixiert und ihre rechte Schuhsohle an der Außenkante mehr als links abgelaufen. Beim Schreibtest mit der linken Hand, streckte sich der rechte Daumen und die Füße bewegten sich mit.

Ein Onkel (II/6) und eine weitere Tante (II/4) der Indexpatientin zeigten ebenfalls einen deutlich pathologischen Schreibtest, und der eineinhalbjährige Sohn der letzteren hatte eine motorische Entwicklungsverzögerung und sollte wegen fehlgestellter Füße Einlagen bekommen.

Von dem verstorbenen Großvater der Indexpatientin (I/1) wurde berichtet, daß er „komisch“ gelaufen und in seiner Kindheit wegen eines „Klumpfußes“ operiert worden sei.

4.1.6 FAMILIE 6

Die Indexpatientin dieser Familie (III/1) ist nach Angaben der Eltern „schon immer ein bißchen komisch“, mit den Füßen nach innen zeigend, gelaufen. Auch eine Fotografie im Kleinkindesalter zeigt eine dystone Fußstellung (Abb. 4-4).

Im Grundschulalter wurden nach Anstrengung Schmerzen in den Schienbeinen bemerkt. Mit etwa 10 Jahren verschlechterte sich die Symptomatik an den Füßen schlagartig mit deutlicher Zunahme im Laufe des Tages, so daß bald eine orthopädische Operation am rechten Fuß vorgenommen wurde. Im Alter von ungefähr 13 Jahren waren die Fußzehen ganztägig gebeugt, ab etwa 10 Uhr waren die Daumen hyperextendiert und die Hände zitterig. Nach Anstrengung waren außerdem die Arme außenrotiert und der Kopf nach links flektiert. Abends konnte die Patientin nicht mehr laufen. Nach Diagnosestellung mit 14 Jahren trat nach Gabe von 100 mg L-Dopa sofortige Besserung ein. Unter dieser täglichen Dosierung war die Patientin zum Zeitpunkt der Untersuchung beschwerdefrei. Sie gab je-

doch an, daß sie gegen Abend lauter laufen, d. h. den Fuß nicht mehr richtig abrollen würde. Beim Schreibtest mit der linken Hand fiel rechts eine dystone Bewegung des Daumens auf. Auffälliges Verhalten und Aggressivität führten vorher zu Fehldiagnosen und bedurften nach Aussage der behandelnden Ärzte noch nach medikamentöser Therapie psychotherapeutischer Behandlung.

Auch ihre Schwester (III/2) gab Schmerzen in den Schienbeinen bei längerem Laufen an, zeigte jedoch keine weiteren dystonen Symptome.



Abb. 4-4 FAMILIE 6. Fotografie der Indexpatientin.

Der Vater der beiden Mädchen (II/3) merkte schon seit seiner Kindheit ein starkes Zittern in den Händen, und hatte Schmerzen nach längeren Spaziergängen, allerdings in den Waden. Seine Schuhe zeigten deutliche Außenkantenbelastung. Seine Fußzehen waren ähnlich wie bei seiner erkrankten Tochter hyperflektiert mit Verstärkung beim Laufen. Auch im Schreibtest mit der linken Hand wurde der rechte Daumen dyston gebeugt.

Der Vater des Vaters (I/1) hatte schon als jüngerer Mensch ein Korsett getragen, sein Gang war kleinschrittig und „schlurfend“ und die Hände waren außenrotiert und zitterten stark.

Auch in der mütterlichen Familie gab es Anhalte für eine dystone Bewegungsstörung. Die Mutter selbst (II/4) erkrankte im Alter von drei Jahren an Kinderlähmung. Nach einem halben Jahr stationären Aufenthaltes war sie weitgehend geheilt, Schulsport war ihr jedoch

immer zu anstrengend gewesen. Beide Großzehen waren seit der Kindheit hyperextendiert und „durchbohrten“ regelmäßig ihre Schuhe. Mit etwa 43 Jahren entwickelte sie biparietale Kopf- und Nackenschmerzen mit intermittierender Ausstrahlung in den seitlichen rechten Oberarm, das Schreiben war erschwert. Außerdem litt sie unter Gangunsicherheit, die besonders in der Dunkelheit und mit geschlossenen Augen zunahm. Nach gründlicher neurologischer Untersuchung sowie unter Beurteilung von Röntgen- und MRT-Aufnahmen wurden die Brachiocephalgien auf degenerative Veränderungen der Halswirbelsäule zurückgeführt und die Gangunsicherheit wurde als Folge einer degenerativen Mikroangiopathie interpretiert, die sich als vereinzelte kleine Marklagerherde im MRT demaskierte. Im Schreibtest auf dystone Zeichen mit der linken Hand überstreckte sie den rechten Daumen, zusätzlich reagierte der rechte Fuß mit einer Flexion.

Ihre Schwester (II/8), die leider nicht untersucht werden konnte, wurde mehrmals am Daumen operiert und litt unter Verspannungen. Deshalb begab sie sich auch in psychotherapeutische Behandlung.

Ein Bruder (II/5) mit einem Polytrauma in der Vorgeschichte zeigte auch diskrete dystone Flexion im Schreibtest. Seine Tochter wiederum (III/3) war in ihrer Kindheit häufig gefallen und deshalb operativ behandelt worden. Seit dem Jugendalter entwickelte sie starken Ruhetremor in den Händen. Ihr Gang war zum Zeitpunkt der Untersuchung unauffällig, beim Schreibtest mit links zeigte sich jedoch eine dystone Haltung der rechten Hand.

Der Stammbaum dieser Familie ist im Zusammenhang mit der SSCP-Untersuchung in Kapitel 5.1.4 abgebildet.

4.1.7 FAMILIE 7

Bei der Indexpatientin (III/1) dieser Familie bestand seit dem 7. Lebensjahr eine Dystonie des linken Fußes mit Supination nach Belastung. Mit 12 Jahren wurde eine Operation wegen eines Senk-Knick-Fußes rechts durchgeführt. Seit ihrem 20. Lebensjahr nahm sie wegen offener L-Dopa Sensibilität 30 mg Pravidel ein und war darunter zunächst beschwerdefrei. Im Alter von 23 Jahren traten dystone Bewegungen der Zehen am rechten Fuß in Ruhe auf, die aber nicht schmerzten oder sie beeinträchtigten. Diese Symptome waren deutlich von der Tageszeit abhängig und regenerierten im Schlaf. Eine medikamentöse Umstellung auf L-Dopa wurde der Patientin empfohlen, aber von ihr nach Studieren

des Beipackzettels abgelehnt. Weiterhin war bei dieser Patientin eine beidseitige Hüftdysplasie bekannt, die ihr nach längerem Gehen und Stehen Schmerzen bereitete und so im Alter von 24 beidseits operiert wurde. Der Schreibtest mit der linken Hand führte im linken Fuß zur Streckung im Sprunggelenk und zur Beugung der Zehen.

Besorgt war diese Patientin um ihre 2jährige Tochter (IV/1), die wegen „Sichelfüßchen“ nach Geburt beidseitig Gipsschienen erhielt. Die Mutter berichtete, daß das Kind beim Laufen häufig umknicke. Bei der Untersuchung konnte lediglich eine angedeutete Supinationsstellung beobachtet werden.

Die bereits verstorbene Großmutter (I/1) der Indexpatientin hatte ein auffälliges Gangbild mit einem nach innen rotierten Fuß gehabt. Alle weiteren Familienmitglieder waren nach Angaben der Indexpatientin unauffällig.

Der Stammbaum dieser Familie ist im Zusammenhang mit der SSCP-Untersuchung in Kapitel 5.1.4 abgebildet.

4.1.8 FAMILIE 8

Der Indexpatient (III/1) war der einzige seiner Familie, der klinisch und molekulargenetisch untersucht wurde. Seine Diagnose lautet Morbus Parkinson, er wurde trotzdem in unsere Untersuchungen aufgenommen, weil seine Krankengeschichte durchaus der einer Dopa-responsiven Dystonie gleicht.

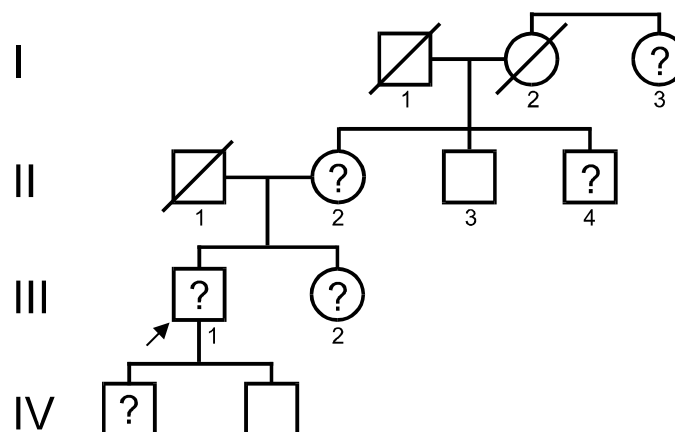


Abb. 4-5 Stammbaum der FAMILIE 8. Der Pfeil markiert den Indexpatienten.

Als Kind trug der Patient Einlagen wegen Senk-Spreizfüßen. Im 14. Lebensjahr „verkrampfte“ sich sein linker Fuß mehr als der rechte mit starker Beugung der Zehen. Außerdem hatte er seit Schulbeginn Schwierigkeiten beim schnelleren Schreiben, im 15. Lebensjahr führte dies besonders unter Streß zur Schreibhemmung und beeinträchtigte ihn auch später in seinem Beruf. Ferner klagte er über Stand- und Gangunsicherheit, er hatte das Gefühl, nach vorne zu fallen. Seine Symptome wurden in mehreren Kliniken als psychosomatisch bedingt verkannt. Sie waren progredient und bis zu einem Aufenthalt in einer Parkinson-Fachklinik im Alter von etwa 42 Jahren war er nicht mehr in der Lage, ohne fremde Hilfe zu gehen. Im Rahmen der Untersuchungen in dieser Klinik fiel dann der Apomorphintest (Apomorphin ist ein Dopaminagonist) positiv aus, so daß die Parkinson-Diagnose gestellt und eine Therapie mit L-Dopa eingeleitet wurde. Es trat eine deutliche Besserung der Symptomatik ein, der Patient konnte wieder mehrere Kilometer ohne Beschwerden gehen.

Der Patient gab an, daß sein ältester Sohn (IV/1) und seine Schwester (III/2) ebenfalls Probleme beim Laufen haben. Auch weitere Familienmitglieder der mütterlichen Seite haben Parkinson-Symptome. Er berichtet, daß seine Mutter (II/2) zittere und Schwierigkeiten zu laufen habe. Ein Onkel (II/4) habe einen grobschlägigen Tremor und die Schwester seiner Großmutter (I/3) leide seit einer Infektion im 18. Lebensjahr an Parkinson-Symptomatik.

4.1.9 FAMILIE 9

Dieser Indexpatient wurde als einziger seiner Familie untersucht. Seine Krankengeschichte beginnt erst im 47. Lebensjahr mit Steifheit und unwillkürlichen Bewegungen der Zunge. Die Koordination der Zungenbewegung verschlechterte sich, und innerhalb eines Jahres entwickelte der Patient eine Dysarthrie. Es wurde eine oromandibuläre Dystonie diagnostiziert. Seine Symptome verschlechterten sich bei körperlicher Anstrengung und verminderten sich nach Ruhepausen. Initial wurde der Patient mit Trihexyphenidyl, danach mit Lorazepam behandelt, jeweils mit nur geringem therapeutischen Erfolg. Durch lokale Botulinus-Toxin-Injektionen in das Pterygoideum konnte der Mund wieder besser geöffnet werden, die Sprache blieb jedoch dysarthrisch.

Auch bei diesem Patienten wurde eine diskret pathologische Haltung der rechten Hand während des Schreibens mit links beobachtet. Dies war jedoch das einzige dystone Zeichen außerhalb des oromandibulären Bereichs.

In seiner Familie gab es keinen sicheren Hinweis auf weitere Dystoniefälle. Lediglich sein Vater habe als Kind seltsame Gesichtsbewegungen gehabt, die im Jugendalter verschwanden; er starb aber mit 54 Jahren an einem Schlaganfall und war so einer genetischen Untersuchung nicht mehr zugänglich.

Die Mutationen dieses Patienten werden in Kapitel 5.1.4 beschrieben.

4.2 Krankenberichte von institutsfremden Ärzten

4.2.1 FAMILIE 10

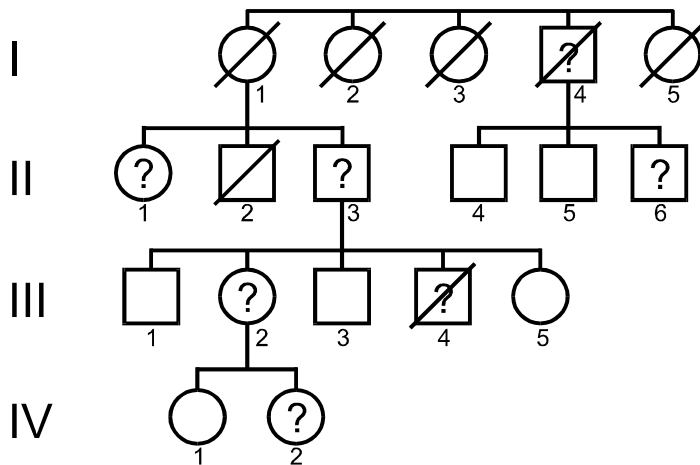


Abb. 4-6 Stammbaum der FAMILIE 10.

Die Information dieser Familie ging uns von einer Ärztin zu, die den Verdacht erhob, daß eine milde Ausprägung der Dopa-responsiven Dystonie in ihrer Familie vorliegen würde. Sie berichtete, daß sie selbst (III/2) eine auffällige Fußform habe, auf den Fußaußenkanten laufen würde, unter Muskelverspannungen und –krämpfen sowie Schreibkrämpfen leide und bei körperlicher Anstrengung leicht ermüde. Ihre Tochter (IV/2) habe ebenfalls eine auffällige Fußform, Hammerzehen, ermüde schnell und bekäme hin und wieder Schreibkrämpfe.

Ein Bruder der Ärztin (III/4) hatte auch auffällige Füße mit Hammerzehen und beging bei bekannter bipolarer Psychose Suizid.

Der Vater (II/3) würde ebenso wie sie bei auffälliger Fußform auf den Fußaußenkanten laufen und leide unter Muskelverspannungen und –krämpfen. Dessen Schwester (II/1) habe Hammerzehen. Bei einem Onkel der beiden (I/4) waren auch auffällige Füße bekannt, und einer seiner Söhne (II/6) leide unter dem Parkinson-Syndrom.

4.2.2 FAMILIE 11

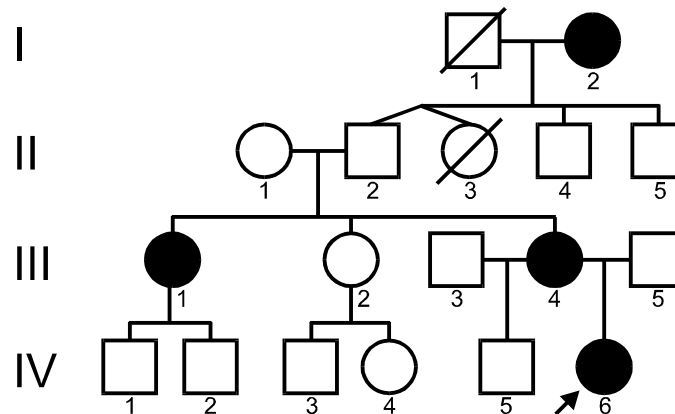


Abb. 4-7 Stammbaum der FAMILIE 11. Der Pfeil markiert die Indexpatientin.

Die Information über diese Familie ging uns aus einer Universitätskinderklinik zu. Die Indexpatientin (IV/6) dieser Familie hatte eine Gangstörung seit dem Alter von 5 Jahren und war im Alter von 8 Jahren unter 50 mg L-Dopa symptomfrei.

Eine Tante (III/1) hatte ebenfalls eine Gangstörung seit dem 5. Lebensjahr und ist unter L-Dopa beschwerdefrei.

Auch die Mutter (III/4) der Indexpatientin und deren Großmutter (I/2) hatten eine Gangstörung seit der Kindheit, über eine erfolgte Therapie ist uns jedoch nichts bekannt.

4.2.3 FAMILIE 12

Auch die Information über diese Indexpatientin ging uns über eine Universitätskinderklinik zu. Mit zwei Jahren wurde sie erstmalig wegen Genua valga einem Orthopäden vorgestellt. Im Alter von 4 Jahren verschlechterte sich das Gangbild kontinuierlich mit häufigem Hinfallen sowie Problemen beim Treppensteigen. Bereits damals wurde eine Zunahme der Symptomatik im Tagesverlauf bemerkt. Mit 5½ Jahren führte dann eine deutliche dystone

Fußfehlstellung in Supinationshaltung links mehr als rechts und eine spontane Dorsalex-tension der linken Großzehe sowie die Tatsache, daß das Mädchen trotz immenser Gang-störung völlig unbeeinträchtigt krabbeln konnte zu dem Verdacht auf das Vorliegen einer Dopa-responsiven Dystonie. Unmittelbar nach Beginn der Therapie mit 50 mg L-Dopa morgens, trat eine deutliche Besserung der Bewegungsstörung auf. Wegen nächtlicher Myoklonien wurde die Dosis halbiert, worunter die Patientin weiterhin beschwerdefrei war.

Die übrigen Familienmitglieder zeigten keine dystone Symptomatik.

Der Stammbaum dieser Familie ist im Zusammenhang mit der SSCP-Untersuchung in Kaptitel 5.1.4 abgebildet.

4.2.4 FAMILIE 13

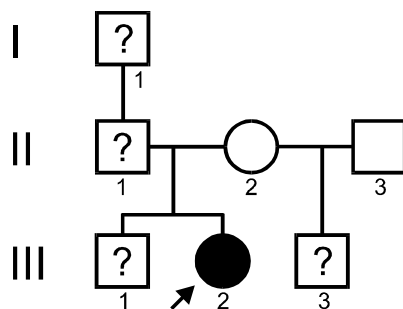


Abb. 8 Stammbaum der FAMILIE 13. Der Pfeil mar-
kiert die Indexpatientin.

Die Indexpatientin dieser Familie (III/2), deren Krankengeschichte uns über die neurologi-sche Abteilung einer Universitätsklinik zugging, zog seit dem 5. Lebensjahr einen Fuß nach, nach initialer Linkshändigkeit mußte sie wegen progredienter Dystonie auf Schreiben mit rechts umlernen, bekam mit 15 Jahren einen Rollstuhl und zeigte zuletzt eine generalisierte Dystonie mit Retrocollis, Strecksymptomatik beider Beine und besonders des linken Arms und Masseterkrampf mit Sprechunfähigkeit bei Aufregung. Ihre Symptome waren morgens kaum ausgeprägt – Gehen und Sprechen waren möglich – abends dagegen stark. Auf eine tägliche Dosis von 250 mg L-Dopa sprach die inzwischen erwachsene Patientin prompt an und konnte durch den gesamten Tag hindurch gehen und sprechen.

Auch bei weiteren Familienangehörigen, von denen uns kein Blut zur molekulargenetischen Untersuchung zugging, gab es Anzeichen für das Vorliegen einer Dopa-responsiven Dystonie. Der ältere Bruder (III/1) habe eine generalisierte Dystonie bei Oligophrenie und

angedeutetem Flügelfell. Ein hypoxischer Hirnschaden wurde diskutiert, er habe nie Dopa bekommen. Ein jüngerer Halbbruder (III/3) habe eine spastische Hemiparese nach Geburtstrauma und bekäme ebenfalls kein Dopa. Die Mutter ist unauffällig, ihre Familie nach eigenen Angaben ebenso.

Der Vater (II/1) der Indexpatientin war durch extrem aggressives Verhalten innerhalb der Familie auffällig geworden. Sein Vater (I/1) wiederum habe seit seiner Jugend ein progredientes Leiden, gehe seit Jahren am Stock, sei steif und zittere.

4.2.5 FAMILIE 14

Die Krankengeschichte dieser einzelnen Patientin entstammt der neurologischen Abteilung einer Universitätsklinik. Die Beschwerden der Patientin begannen im 7. Lebensjahr mit einer Fehlstellung des rechten Fußes beim Gehen, wobei dieses Symptom initial eine deutliche zirkadiane Rhythmik aufwies mit deutlicher Besserung nach dem Schlaf. Die dystone Gangstörung nahm über die Jahre zu, und seit dem 20. Lebensjahr beklagte die Patientin eine „ungelenke Schrift“. Im Alter von 17 Jahren trat ein muskulärer Torticollis nach rechts auf, der vier Jahre später mit einer beidseitigen Rhizotomie von C1 bis C3 und im darauffolgenden Jahr mit einer Accessoriotomie links jeweils ohne wesentlichen Therapieerfolg behandelt wurde.

Spätestens seit ihrem 57. Lebensjahr ließ sich fremdanamnestisch ein Ruhetremor sichern. Mit 61 Jahren stellte sich die Patientin dann mit einer hochgradigen bradykinetischen Gangstörung in der neurologischen Klinik vor. Dort fiel außerdem in beiden Armen ein Zahnradphänomen auf. Ferner zeigten sich dystone Stellung in beiden Sprunggelenken, knöchern fixierte Fehlstellungen des linken Knies und der Hüften sowie der Wirbelsäule und der noch immer vorhandene Torticollis nach rechts.

Auf 400 mg L-Dopa sprach sie prompt an, wegen der knöchern fixierten Fehlstellungen war sie jedoch nicht beschwerdefrei.

Da die Patientin mit ihrer Familie keinen Kontakt hatte, ist über weitere eventuell betroffene Familienmitglieder nichts zu berichten.

Die Mutation dieser Patientin wird in Kapitel 5.1.4 beschrieben.

4.2.6 FAMILIE 15

Die Informationen über diese Familie gingen uns durch die neurologische Abteilung einer Universitätsklinik zu.

Die Indexpatientin (II/1) litt seit dem dritten Lebensjahr unter progredienter generalisierter Dystonie, die zunächst als infantile Zerebralparese fehlinterpretiert wurde. Zunächst fiel eine Gangstörung auf, die durch linksbetonte Inversion der Füße und Beugung in den Kniegelenken gekennzeichnet war. Ab dem 8. Lebensjahr traten generalisierte unkontrollierte Muskelverkrampfungen inklusive Schiefhals mit fluktuierender Ausprägung auf. Trotz unauffälliger Geburtsanamnese wurde die Bewegungsstörung auf eine leichte frühkindliche Hirnschädigung zurückgeführt.

Im Alter von 35 Jahren erfolgte die erneute neurologische Vorstellung wegen der seit drei Jahren zunehmenden Bewegungsstörung, die die Patientin sozial und in ihrer Berufsfähigkeit erheblich beeinträchtigte. Die freie Gehstrecke betrug nur weniger als 50 m. Die neurologische Untersuchung ergab keinen Anhalt für Paresen und keine Affektion der Pyramidenbahn. Erstmals wurde eine generalisierte Dystonie diagnostiziert und ein Therapieversuch mit 100 mg L-Dopa unternommen, der bereits in den ersten Behandlungstagen zu einer vollständigen Besserung der Symptomatik führte.

Klinisch bestanden keine Auffälligkeiten der Eltern, auch bezüglich dystoner Minimal-symptome ist die Familienanamnese leer.

Der Stammbaum dieser Familie ist im Zusammenhang mit der SSCP-Analyse in Kapitel 5.1.1 abgebildet.

4.2.7 FAMILIE 16

Die Information über diese Familie ging uns ebenfalls über eine Universitätsklinik zu.

Die Indexpatientin fiel im Alter von 5 Jahren erstmals durch Innenrotation des rechten Fußes und leichte Pfötchenstellung der rechten Hand auf. Retrospektiv betrachtet habe das Mädchen bereits im Säuglingsalter hypertone Muskulatur gebabt.

Bis zum Alter von 9 Jahren zunehmende Verschlechterung mit Generalisierung der Symptomatik. Dann Therapiebeginn mit Nacom[®] (40-20-20 mg), darunter ist das Mädchen völlig asymptomatisch.

Die Familienanamnese ist bis auf eine Osteoporose der Großmutter unauffällig.

Der Stammbaum der Familie ist im Zusammenhang mit der SSCP-Analyse in Kapitel 5.1.4 abgebildet.

4.2.8 FAMILIE 17

Die Krankengeschichte dieser einzelnen Patientin entstammt auch der neurologischen Abteilung einer Universitätsklinik.

Im Alter von 47 Jahren entwickelte diese Patientin innerhalb von vier Wochen einen Blepharospasmus und eine oromandibuläre Dystonie im Sinne eines Meige-Syndroms, darunter auch Gewichtsabnahme von ca. 10 kg. Nach initialer Behandlung mit Artane® (Anticholinergikum) besserte sich zwar die orofaziale Dystonie, aber zusätzlich trat eine choreatisch anmutende Bewegungsunruhe mit einschließenden Bewegungen in den linken Arm und unwillkürlichem Anheben der Schultern sowie Schmerzen im Nackenbereich auf. Die Symptomatik wurde durch Belastung verstärkt, an manchen Tagen war die Patientin sogar beschwerdefrei. Eindeutige tageszeitliche Schwankungen waren nicht vorhanden. Die zusätzliche Therapie mit Tegretal® (Carbamazepin, Antikonvulsivum) erbrachte keine Besserung, so daß zunächst die Diagnose einer multifokalen Dystonie gestellt wurde.

Bei der Patientin bestanden keine psychisch intellektuellen Veränderungen, auch die Familienanamnese bezüglich neuropsychiatrischer Erkrankungen war unauffällig.

Bei der erneuten neurologischen Abklärung wegen fortbestehenden Beschwerden nach mehreren Therapieversuchen mit anticholinergen Substanzen wurde nach unauffälliger cranieller MRT, dem Ausschluß eines Morbus Wilson und einem positiven Apomorphin-Test eine Therapie mit L-Dopa begonnen (einschleichend Madopar 125® 3x2 Tbl.), worunter sich die Symptomatik deutlich besserte. Der Verdacht auf eine Dopa-responsive Dystonie wurde geäußert und die molekulargenetische Untersuchung veranlaßt.

Nach zwei Monaten L-Dopa-Therapie trat jedoch schon ein Wirkungsverlust ein, es wurden mehrere Medikamente aus der Parkinson-Therapie sowie ein Benzodiazepin verabreicht, wodurch auch keine völlige Beschwerdefreiheit erzielt werden konnte, so daß die Patientin 10 Jahre nach Erkrankungsbeginn erfolgreich mit einer Apomorphin-Pumpe ausgestattet wurde.

4.2.9 FAMILIE 18

Die Informationen über diesen einzelnen Patienten erhielten wir über dessen Hausarzt.

Im Alter von 44 Jahren begann die Erkrankung dieses Patienten zunächst mit Tremor in der linken oberen Extremität, nach einigen Jahren zunehmend.

Zusätzlich traten nächtliche Dystonien auf, später auch tagsüber. Elf Jahre nach Krankheitsbeginn litt der Patient unter solchen Hyperkinesien, „so daß er sich nicht mehr unbe-lacht auf die Straße trauen konnte“.

Mit der Behandlungsdiagnose Morbus Parkinson ist der Patient unter einer Medikation von täglich mehr als 500 mg L-Dopa und zusätzlichem Dopaminagonist keineswegs beschwerdefrei. Die Untersuchung auf Dopa-responsive Dystonie wurde veranlaßt wegen der im Rahmen der Erkrankung auftretenden Dystonien mit zunächst tageszeitlichen Schwankungen.

Die Familienanamnese bezüglich dystoner Bewegungsstörungen ist unauffällig.

4.2.10 FAMILIE 19

Bei dieser einzelnen Patientin wurde der klinische Verdacht auf eine Dopa-responsive Dystonie von den Neurologen einer städtischen Klinik geäußert und die molekulargenetische Diagnostik veranlaßt. Weitere Informationen liegen leider nicht vor.

4.2.11 FAMILIE 20

Diese einzelne Patientin stellte sich im Alter von 54 Jahren mit einer fokalen Dystonie der rechten unteren Extremität in der neurologischen Abteilung einer Universitätsklinik vor. Sie gab an, daß sie seit wenige Wochen unter rechtsseitigen lumbalgischen Beschwerden leide. Bereits seit zwei Jahren bestünden Verkrampfungen der rechten Zehen und des Fußes, die zum Zeitpunkt der Vorstellung in starker Ausprägung den Oberschenkel erreicht haben, so daß sie zeitweise Gehilfen benötigte. Diese Bewegungsstörung unterliege tageszeitlichen Schwankungen mit der stärksten Beeinträchtigung um die Mittagszeit. Auf Befragung gab sie an, daß bereits in ihrer Kindheit beim Gehen die rechte Großzehe dorsal-extendiert war.

Bei der Untersuchung fiel eine dystone Innenrotationsstellung des rechten Beines mit Supinationsstellung des rechten Fußes auf. Beim Bestreichen der Fußsohle kam es zur Dorsalextension der Großzehe, wobei bei bekannter Multiplen Sklerose seit neun Jahren und vorhandener Fußheberparese rechts nicht sicher zwischen positivem Babinski-Zeichen und Striatumzehr zu differenzieren war.

In der Familie sind zahlreiche andere Mitglieder wohl ebenfalls von einer dystonen Fußstellung als auch von Hüftgelenks- und Bandscheibenerkrankungen betroffen. Die Tochter der Patientin leide ebenfalls unter Multipler Sklerose und fokaler Dystonie.

Wegen des Verdachts auf eine neben der gesicherten Multiplen Sklerose bestehenden DRD wurde ein Therapieversuch mit L-Dopa vorgenommen, worunter sich bereits unter 3x125 mg Madopar eine eindeutige Besserung ergab. Allerdings war die Patientin auch unter Dosissteigerung niemals beschwerdefrei.

4.2.12 FAMILIE 21

Die Information über diese Familie erhielten wir von dem humangenetischen Institut einer Universitätsklinik.

Bei drei der vier Kinder nichtkonsanguiner gesunder Eltern besteht eine klinisch diagnostizierte Dopa-responsive Dystonie. Alle Patienten werden mit 2x100 mg Nacom[®] behandelt und sind darunter beschwerdefrei.

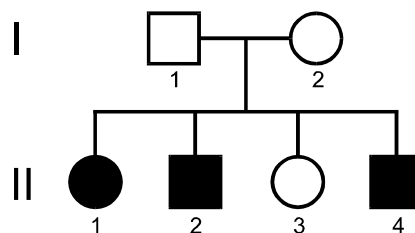


Abb. 4-8 Stammbaum der Familie 21

4.2.13 FAMILIE 22

Diese Patientin wurde in der neurologischen Abteilung einer Universitätsklinik stationär behandelt wegen seit dem 21. Lebensjahr bestehenden Spannungsgefühls sowie Schmerzen von drückendem Charakter in beiden Beinen. Diese Beschwerden nahmen unter Belastung zu, eine tageszeitliche Abhängigkeit bestand jedoch nicht. Bei der Untersuchung fiel eine dystone innenrotierte und supinierte Fehlstellung des rechten Fußes mit beginnender Kontraktur, eine beidseitige Bradydiadochokinese sowie eine geringe dystone Reduktion der Fingerfeinmotorik rechts auf. Außerdem bestand eine rechtsbetonte generalisierte Muskeltonuserhöhung.

Die Patientin leidet zusätzlich seit dem 14. Lebensjahr unter einer arteriellen Hypertonie. Die bildgebende Diagnostik war unauffällig, die Hypertonie-Diagnostik ergab erhöhte Adrenalin-Werte im Serum und erhöhte Normetanephrin-Ausscheidung im Urin.

Unter stationären Bedingungen sprach die Patientin auf L-Dopa an, jedoch ohne völlige Beseitigung der dystonen Symptomatik unter 375 mg Madopar®. Deshalb erfolgte die Umstellung auf Requip® (Ropinirol, Dopamin-Rezeptor-Agonist), worunter sie erst nach Steigerung auf 6 mg/Tag relativ beschwerdearm wurde.

4.3 Weitere molekulargenetisch untersuchte Personen

Die unter Familie 23 und 24 beschriebenen Personen wurden ebenso wie die unter 4.1 beschriebenen Familien von der Arbeitsgruppe des Humangenetischen Instituts des Klinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen untersucht. Bei der Anamnese stellte sich jedoch sehr bald heraus, daß eher kein Verdacht auf eine Dopa-responsive Dystonie besteht, so daß Anamnese und Befund an dieser Stelle eher kurz gehalten werden.

4.2.14 FAMILIE 23

Die „Index“-Patientin dieser Familie wurde als der zweite Zwilling geboren. Perinatal kam es zu einer Asphyxie. Seit dem frühen Säuglingsalter fiel eine Tetraspastik auf. Die Patientin war zum Zeitpunkt der Untersuchung ca. 45 Jahre alt, beim Gehen fühlte sie sich manchmal blockiert, es fiel ihr morgens leichter als abends. Keine Medikation.

Keine weiteren Familienmitglieder zeigen für eine Dopa-responsive Dystonie typische Symptome.

4.2.15 FAMILIE 24

Der „Index“-Patient dieser Familie fiel im Alter von neun Jahren durch Laufen auf den Außenkanten auf, seitdem spricht er auch gepreßt und leidet unter Belastungszittern. Zu Beginn unterlag diese Symptomatik einer ausgeprägten tageszeitlichen Schwankung, zum Zeitpunkt der Untersuchung traten die Bewegungsstörungen aber auch schon morgens auf. Durch eine Muskelbiopsie wurde bereits die Diagnose einer hereditären sensiblen Neuropathie Typ II (Dyck) gestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Molekulargenetische Untersuchungen am GTP-Cyclohydrolase I-Gen (*GCHI*)

Mit DNA der Indexpatienten aus 24 untersuchten Familien wurden „Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)“-Analysen (siehe Kapitel 3.6) aller sechs Exone von *GCHI* durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer und deren PCR-Bedingungen sind in Tabelle 3-2 (Kapitel 3.3.3) zusammengefaßt.

Fiel dabei in einem von einem bestimmten Primerpaar begrenzten DNA-Bereich (Exon mit angrenzendem Intron) bei einem Patienten eine Basenverschiebung („band shift“) auf, wurde dieser Abschnitt der Patienten-DNA zyklisch sequenziert und auf Mutationen untersucht (siehe Kapitel 3.7). Wurde so eine Mutation aufgedeckt, folgte eine SSCP-Analyse der weiteren Familienmitglieder mit dem Indexpatienten als Positivkontrolle.

Auf diese Weise wurden im Rahmen dieser Arbeit bei neun der 24 Familien Mutationen in *GCHI* als Ursache der Erkrankung festgestellt, wobei sechs der acht verschiedenen Mutationen vorher noch nicht beschrieben waren (siehe Tabelle 5-1).

Nicht alle Mutationsträger sind an Dopa-responsiver Dystonie erkrankt oder benötigen bei Minimalsymptomen eine medikamentöse Therapie. Einen Überblick darüber soll Tabelle 5-2 geben.

Tabelle 5-1 Mutationen dieser Promotionsarbeit

Genlocus	Mutation	Nukleotide	Effekt	FAMILIE
Exon 1	Transition C68T, dominant ⁺	CCC→CTC	Pro23Leu	15
Exon 1	Transversion C225A, dominant	TAC→TAA	Tyr75Stop	4
Intron 4	Transversion g(+1)c, sporadisch	Splice site Mutation	?	2
Intron 4	Transversion a(-2)c, dominant	Splice site Mutation	?	16
Exon 5	Transition G582A, Vererbung n. b.	ACG→ACA	stumme Mutation	9
Exon 5	Transversion G586T, Vererbung n. b.	GCC→TCC	Ala196Ser	9
Exon 5	Transition G607A, sporadisch *	GGG→AGG	Gly203Arg	6, 12
Intron 5	Insertion (+3)ins t, Vererbung n. b.	Splice site Mutation	?	7, 14

bereits vorbeschrieben in [3]*, [20, 55]⁺

Tabelle 5-2 Charakteristika der Mutationsträger (n=16)

klinisch asymptomatisch	4 Personen
Alter bei Beginn der Symptome	1-8 Jahre, 46 Jahre
eindeutige tageszeitliche Schwankungen	9 Patienten
Rollstuhlpflicht / zeitweilige Unfähigkeit zu Laufen	4 Patienten
medikamentös behandelt	10 Patienten
Dopa-Responsivität (bei behandelten Patienten)	10 Patienten
Tagesdosis L-Dopa	25-400 mg (30 mg Pravidel)
Beschwerdefreiheit unter medikamentöser Therapie bei	6 Patienten
Latenzzeit bis zum Beginn der medikamentösen Therapie	2-55 Jahre, Ø ca. 16 Jahre

Im Anhang sind alle zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit (6/2001) bekannten Mutationen im für die GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) codierenden Gen tabellarisch zusammengefaßt (Tabelle 7-2).

Die vollständige Sequenz der sechs Exone von *GCHI* sowie der angrenzenden Introne ist in Kapitel 7.1 dargestellt.

Anmerkung: Ein Ziel der Arbeit war, die PCR-Bedingungen für alle in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare so zu verändern und auszuarbeiten, daß die Reaktionen stabil und beliebig reproduzierbar sind. Dieses Ziel konnte jedoch nur annähernd erreicht werden, weshalb in der Tabelle 3-2 (Kapitel 3.3.3) lediglich die Cyclex-Programme festgehalten sind. Aber auch diese waren jeweils für ein Gerät spezifisch.

Die Reaktionsbedingungen für jedes Primerpaar variierten in Magnesiumchlorid-Konzentration, Chargen der Taq-Polymerasen und Zusätzen; manchmal mußten die Bedingungen völlig neu getestet werden, wenn die Oligonukleotide neu hergestellt oder gar nur aliquotiert worden waren. Es gab aber auch „stabile“ Oligonukleotide, bei denen von Zeit zu Zeit nur die Magnesiumchlorid-Konzentration verändert werden mußte.

Die exakten Reaktionszusätze, unter denen die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse erzielt wurden, sind bereits in Kapitel 3.3.3 beschrieben worden.

5.1.1 Mutationen im Bereich von GCH 1.4 A und B

FAMILIE 15 Exon 1, C68T, Pro23Leu

Die SSCP-Analyse von GCH 1.4 dieser Familie zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung bei 4 °C und bei Raumtemperatur je einen „band shift“ bei Mutter I/2 und Tochter II/1 (Abb. 5-1). Die verwendeten Primer waren GCH 1.4 A und B, die Cyclo-Bedingungen sind in Tabelle 3-2 angegeben.

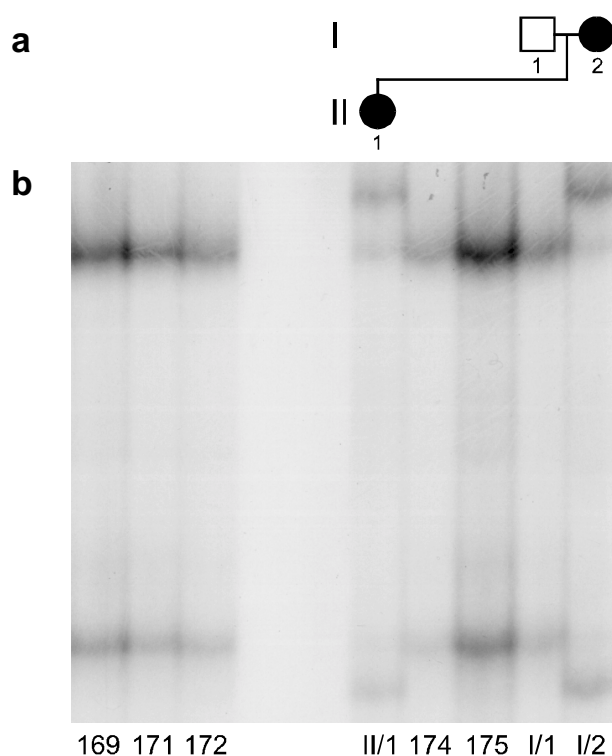


Abb. 5-1 FAMILIE 15. Stammbaum (a) und SSCP von GCH 1.4 (b). Bei II/1 und I/2 ist ein deutlicher „band shift“ zu erkennen. Proben 169-175 sind Kontrollen.

Die Mutter I/2 der in Kapitel 4.2.6 beschriebenen Patientin zeigt nach derzeitigen Kenntnissen keine dystonen oder parkinsonoiden Symptome und ist damit asymptotische Genträgerin. Die Penetranz dieser Kleinfamilie liegt damit bei 50 %.

Die zyklische Sequenzierung dieses Gen-Abschnitts von Patient I/2 (Abb. 5-2) zeigte eine Punktmutation im Exon 1, bei der an der Position 68 ein Cytosin durch ein Thymin ersetzt ist (C68T). Dies führt zu einem Aminosäuren-Austausch an Position 23 der GTPCH I von Prolin zu Leucin (Pro23Leu). Diese Mutation wurde etwa zeitgleich von Jarman et al. [55] und de la Fuente et al. [20] beschrieben und in [70] veröffentlicht.

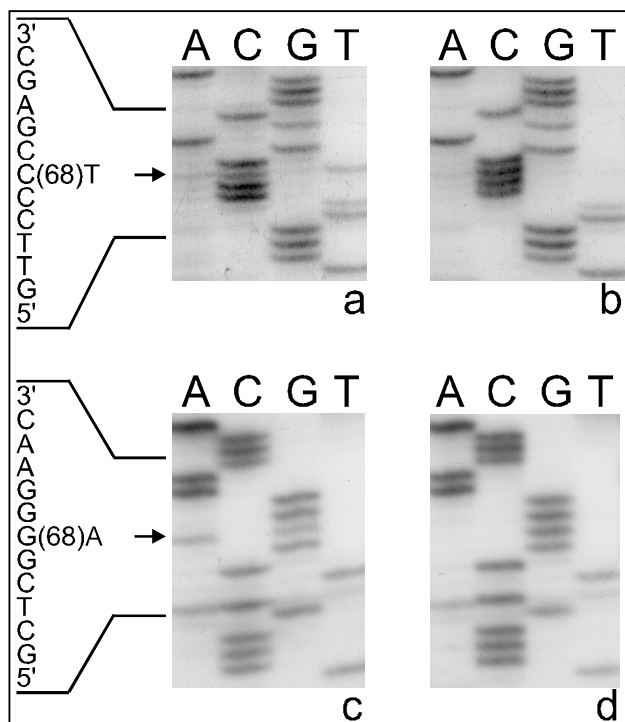


Abb. 5-2 FAMILIE 15. Sequenz der Patientin I/2 von GCH 1.4 mit Strang (a) und Gegenstrang (c). (b) und (d) sind die entsprechenden Kontrollen.

5.1.2 Mutationen im Bereich von GCH 1.6 A und B

FAMILIE 4 Exon 1, C225A, Tyr 75Stop

Die SSCP-Analysen im Abschnitt 1.6 von *GCHI* (GCH 1.6) zeigten „band shifts“ bei sechs der untersuchten Familienmitglieder (Abb. 5-3). Neben den vier klinisch symptomatischen Patienten tragen auch zwei gesunde Personen die Mutation. Damit beträgt die Penetranz dieser Familie 67 %.

Es wurden die Oligonukleotide GCH 1.6 A und B und die in Tabelle 3-2 angegebenen Cycler-Bedingungen verwendet.

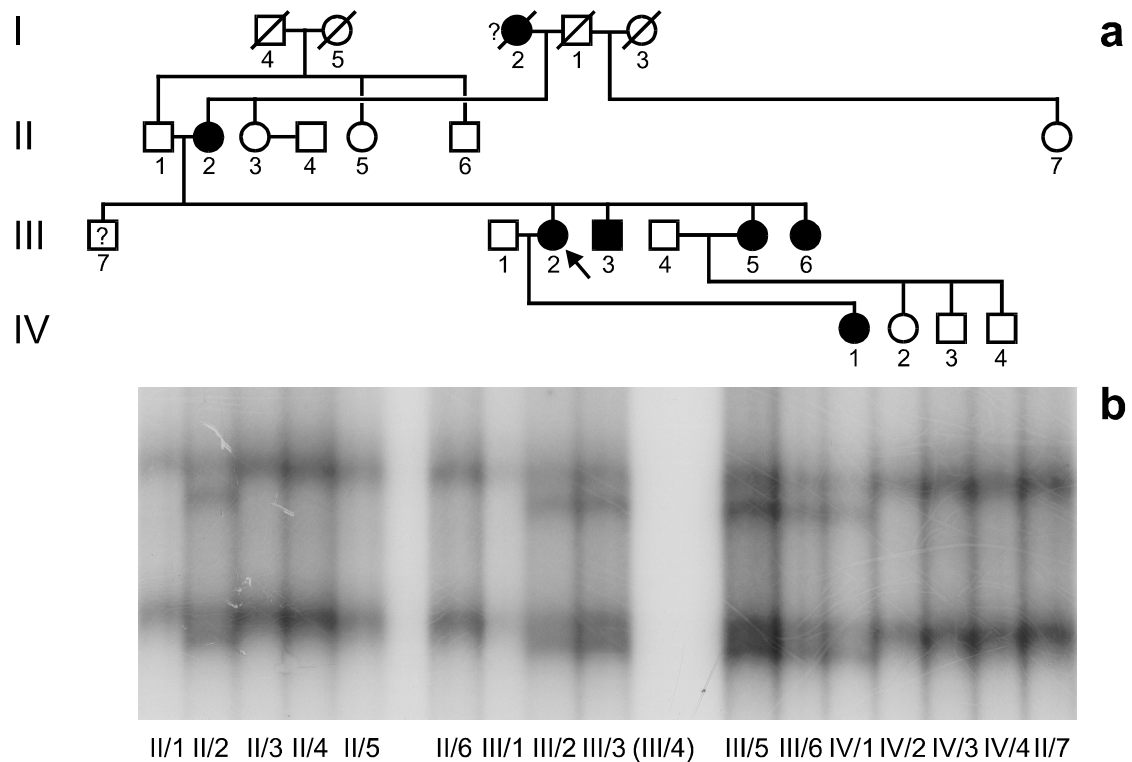


Abb. 5-3 FAMILIE 4. Stammbaum (a) und SSCP von GCH 1.6 (b). Der Pfeil markiert die Indexpatientin. III/4 ließ sich nicht darstellen. Die Personen II/2, III/2, III/3, III/5 und IV/1 haben deutliche „band shifts“. II/2 und III/5 sind asymptomatische Mutationsträger.

Bei der zyklischen Sequenzierung des PCR-Produktes von Patientin IV/1 wurde eine Punktmutation an der Position 225 aufgedeckt (Abb. 5-4). Es handelt sich um eine Transversion von Cytosin zu Adenin, die die 75. Aminosäure des Proteins, Tyrosin, durch ein Stop-Codon ersetzt. Wegen des gleichen „band shifts“ in der SSCP-Analyse kann davon ausgegangen werden, daß auch die Personen II/2, III/2, III/3, III/5 und III/6 diese Mutation tragen.

Auch diese Mutation war vorher noch nicht beschrieben und wurde in [70] veröffentlicht.

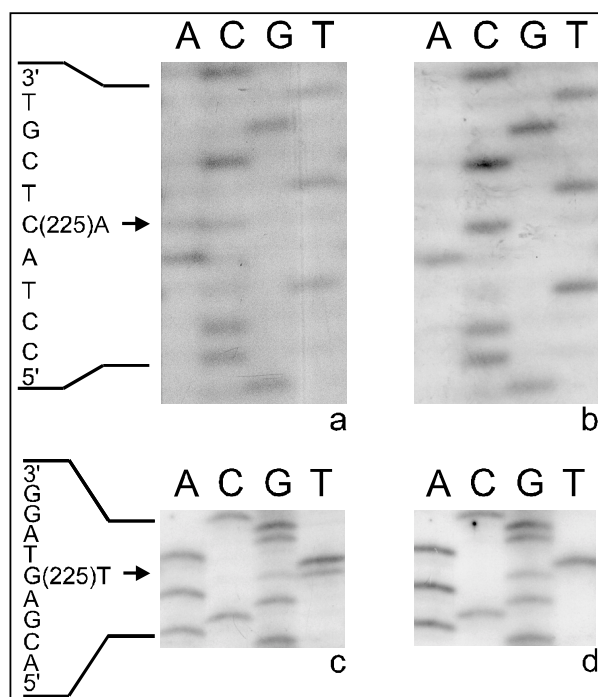


Abb. 5-4 FAMILIE 4. Sequenz der Patientin IV/1 des Genabschnitts GCH 1.6 mit Strang (a) und Gegenstrang (c). (b) und (d) sind die entsprechenden Kontrollen.

5.1.3 Mutationen im Bereich von GCH 4.2 A und B

FAMILIE 2 Intron 4, g(+1)c

Bei der SSCP-Analyse von GCH 4.2 der Indexpatientin III/1 erschien sowohl nach Elektrophorese bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur ein deutlicher „bandshift“, der sich bei keinen weiteren Familienmitgliedern zeigte (Abb. 5-5). Somit handelt es sich um eine Neumutation.

Die verwendeten Primer waren GCH 4.2 A/B verschachtelt in GCH 4.1 A/B (siehe „Verschachtelte PCR“, Kapitel 3.3.4) ohne MgCl₂ und sonstige Zusätze mit den in Tabelle 3-2 angegebenen Cycler-Bedingungen.

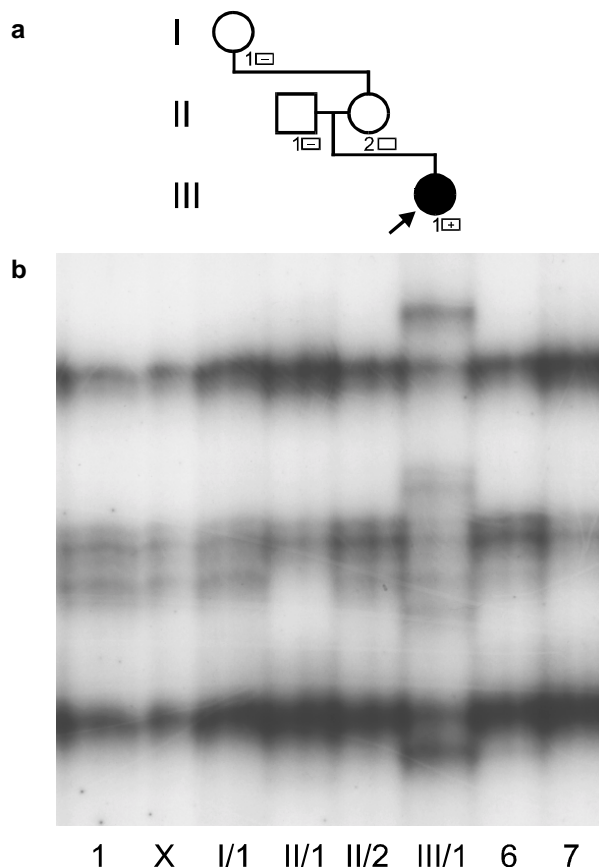


Abb. 5-5 FAMILIE 2. Stammbaum (a) und SSCP von GCH 4.2 (b). Der Pfeil markiert die Indexpatientin. Auftrag 1, 6 und 7 sind Kontrollen, bei X handelt es sich um ein Artefakt. III/1 zeigt einen deutlichen „band shift“.

Die anschließend durchgeführte zyklische Sequenzierung des PCR-Produktes deckte eine Mutation im Intron 4 an der „splice donor site“ auf. Es handelt sich dabei um eine vorher nicht beschriebene Transition von G zu C an der Position +1 [g(+1)c], veröffentlicht in [70]. Ein Ausschnitt der Sequenzierung von Strang und Gegenstrang ist in Abb. 5-6 wiedergegeben.

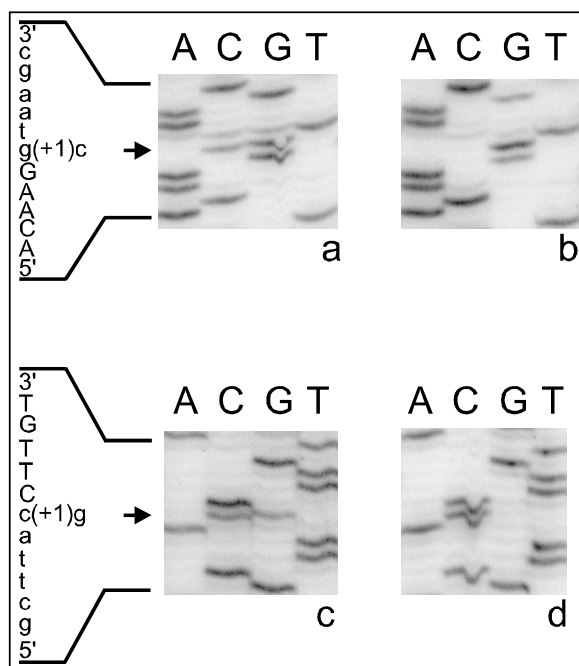


Abb. 5-6 FAMILIE 2. Sequenz der Indexpatientin III/1 von GCH 4.2 mit Strang (a) und Gegenstrang (c). (b) und (d) sind die entsprechenden Kontrollen. In der Sequenz sind die Basen des Exon 4 durch Großbuchstaben und die des Intron 4 durch Kleinbuchstaben dargestellt.

5.1.4 Mutationen im Bereich von GCH 5.1 A und B

Für die folgenden SSCP-Analysen und zyklischen Sequenzierungen wurden die in Tabelle 3-2 abgebildeten Primer GCH 5.1 A und B nach Standardbedingungen ohne $MgCl_2$ oder andere Zusätze verwendet.

FAMILIE 16 Intron 4, a(-2)c

Bei der SSCP-Analyse dieser Familie im Abschnitt GCH 5.1 zeigten die Indexpatientin (II/1) und deren Mutter (I/2) sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4 °C einen deutlichen „band shift“ (Abb. 5-7). Die Mutter I/2 der in Kapitel 4.2.7 beschriebenen Indexpatientin zeigt nach derzeitigen Kenntnissen keine dystonen oder parkinsonoiden Symptome und ist damit asymptotische Genträgerin. Die Penetranz dieser Kleinfamilie liegt damit bei 50 %.

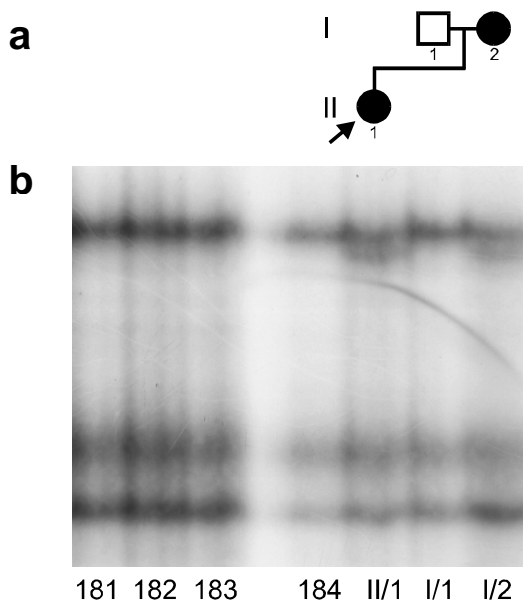


Abb. 5-7 FAMILIE 16. Stammbaum (a) und SSCP-Analyse von GCH 5.1 (b). Die Abbildung zeigt „band shifts“ der Personen II/1 und I/2. 181-184 sind Kontrollen.

Die zyklische Sequenzierung der Patientin II/1 deckte dann eine Mutation an der „splice acceptor site“ im Intron 4 auf. Hier handelt es sich um eine vorher nicht beschriebene Transversion an der Position -2 von Adenin zu Cytosin, die bereits in [70] veröffentlicht wurde. Ein Ausschnitt der Sequenzierung von Strang und Gegenstrang ist in Abb. 5-8 wiedergegeben.

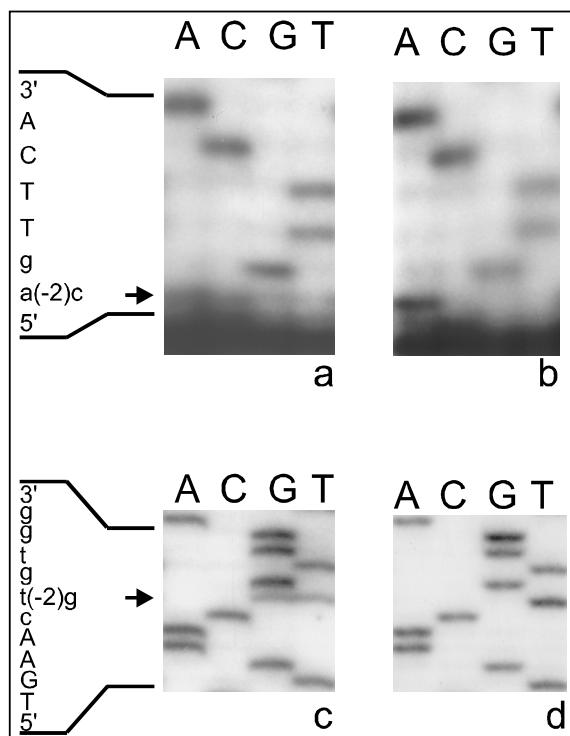


Abb. 5-8 FAMILIE 16. Sequenz der Indexpatientin von GCH 5.1 mit Strang (a) und Gegenstrang (c). (b) und (d) sind die entsprechenden Kontrollen. In der Sequenz sind die Basen des Exon 5 durch Großbuchstaben und die des Intron 4 durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Da die Mutation im Strang im Bereich des Kettenabbruchs liegt und nur sehr schlecht zu erkennen ist, wurde zusätzlich eine T7-Sequenzierung nach Klonierung des PCR-Produktes durchgeführt, bei der jeweils der Bereich nur eines Chromosoms zur Darstellung kommt. Abb. 5-9 zeigt den entsprechenden Abschnitt des betroffenen Chromosoms im Vergleich zu einer Kontrolle.

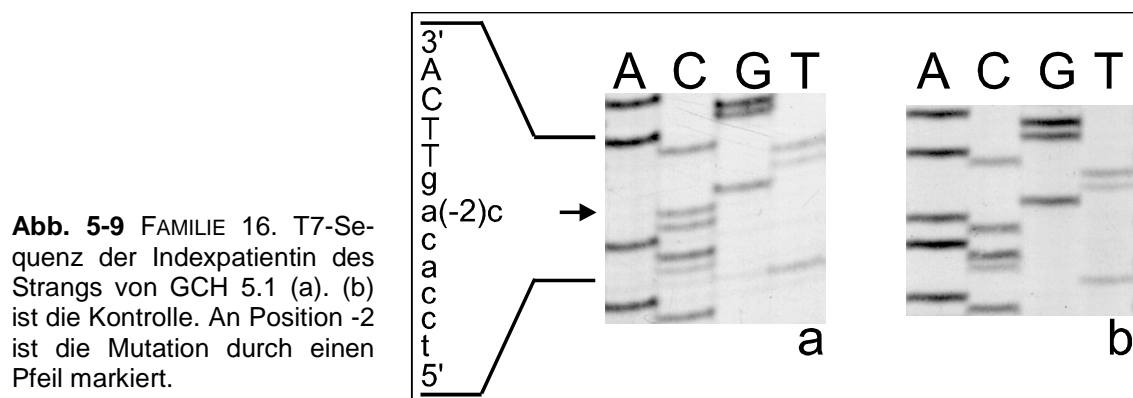
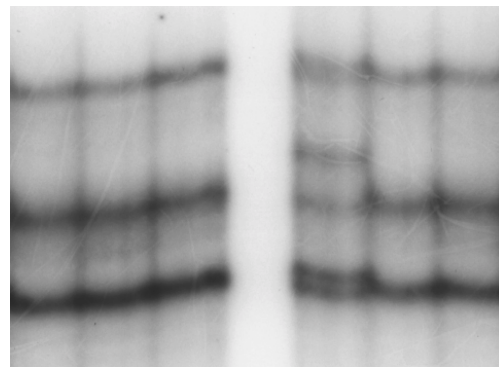
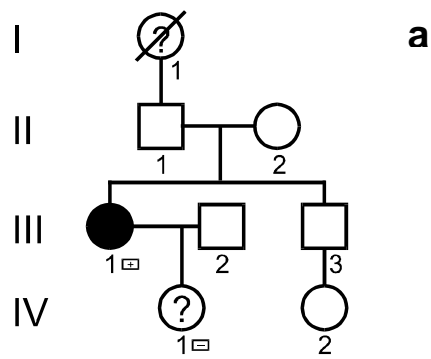


Abb. 5-9 FAMILIE 16. T7-Sequenz der Indexpatientin des Strangs von GCH 5.1 (a). (b) ist die Kontrolle. An Position -2 ist die Mutation durch einen Pfeil markiert.

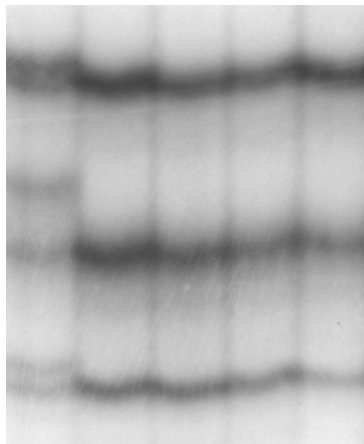
FAMILIEN 7 und 14 Intron 5, (+3) ins t

Patientin III/1 aus FAMILIE 7 und die Indexpatientin der FAMILIE 14 hatten jeweils einen deutlich sichtbaren "band shift" bei der SSCP-Analyse von Exon 5 (Abb. 5-10 und Abb. 5-11).



128 129 130 F14 166 167

Abb. 5-11 FAMILIE 14. SSCP von GCH 5.1. Der Pfeil markiert die Indexpatientin mit deutlichem „band shift“. Die anderen Proben sind Kontrollen.



b III/1 IV/1 176 177 178

Abb. 5-10 FAMILIE 7. Stammbaum (a) und SSCP von GCH 5.1 (b). Die Abbildung zeigt einen deutlichen „band shift“ bei Patientin III/1. 176-178 sind Kontrollen.

Bei der zyklischen Sequenzierung beider Proben wurde die gleiche „splice site“-Mutation im Intron 5 gefunden (Abb. 5-12). Es handelt sich um eine Insertion einer Base T an der Position +3 ((+3) ins t), die vorher nicht beschrieben wurde (veröffentlicht in [70]).

Diese Mutation wurde durch SSCP-Analyse bei der Tochter der Indexpatientin aus Familie 7 (IV/1), die durch einen innenrotierten Fuß auffiel, ausgeschlossen.

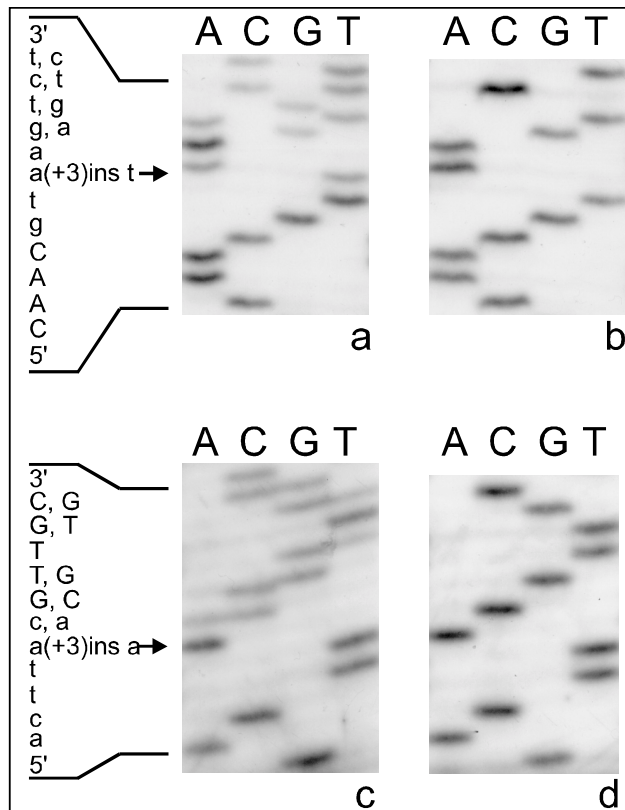


Abb. 5-12 FAMILIE 14. Sequenz der Indexpatientin von GCH 5.1 mit Strang (a) und Gegenstrang (c). (b) und (d) sind die entsprechenden Kontrollen. In der Sequenz sind die Basen des Exon 5 durch Großbuchstaben und die des Intron 5 durch Kleinbuchstaben dargestellt. Patientin III/1 der FAMILIE 7 zeigte die gleiche Mutation.

Bei Familie 7 handelt es sich anamnestisch um eine sporadische Mutation, leider konnten weitere Familienmitglieder nicht molekulargenetisch untersucht werden. Über die Familie 14 liegt bis auf die Indexpatientin keine weitere Information vor. Eine Verwandtschaft der beiden Familien ist nicht bekannt.

Da eine „Splice site“-Mutation dieser Art bisher nicht beschrieben wurde, wurden 100 Kontrollen (Wildtypen) auf eine Veränderung in der SSCP-Analyse untersucht, um auszuschließen, daß es sich um einen Polymorphismus handelt. Keine dieser Kontrollen zeigte einen „band shift“.

FAMILIE 9 Exon 5, G582A (stumme Mutation) und G586T, Ala196Ser

Bei dem Indexpatienten der Familie 9 zeigte die SSCP-Analyse des Genabschnitts GCH 5.1 einen „band shift“ (Abb. 5-13). Von einer klinischen Symptomatik bei weiteren Familienmitgliedern ist nichts bekannt, auch wurden keine anderen Familienmitglieder molekulargenetisch untersucht.

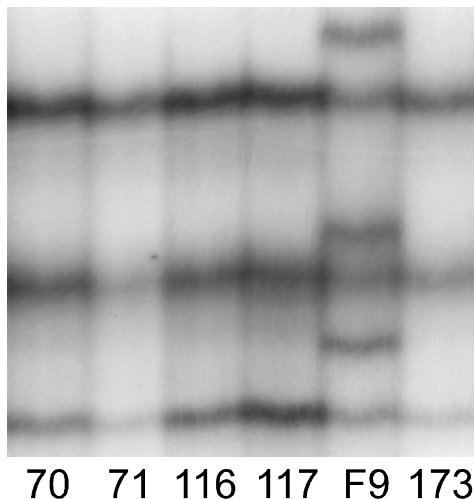


Abb. 5-13 FAMILIE 9. SSCP von GCH 5.1 des Indexpatienten (F9) mit deutlichem „band shift“. Die anderen Proben sind Kontrollen.

Die zyklische Sequenzierung von GCH 5.1 dieser Probe zeigte zwei Basenaustausche im Bereich des Exons 5 (Abb. 5-14). Dabei handelt es sich um eine Transition von G zu A an der Position 582 und um eine Transversion von G zu T an Position 586. Die Transition verwandelt das Codon ACG zu ACA, ist damit eine stumme Mutation und kann sich um einen neutralen Polymorphismus handeln. Sie wurde jedoch bei 100 Kontrollen in der SSCP und bei 15 Kontrollen in der zyklischen Sequenzierung nicht nachgewiesen.

Die Transversion verändert das Codon GCC zu TCC und führt so zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Serin an Position 196 des Proteins.

Um herauszufinden, ob die beiden Mutationen auf einem oder zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, wurde eine T7-Sequenzierung nach Klonierung des PCR-Produktes durchgeführt. Abb. 5-15 zeigt beide Mutationen auf einem Chromosom in Strang und Gegenstrang mit jeweiligen Kontrollen und verdeutlicht den Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante.

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden bereits in [112] veröffentlicht.

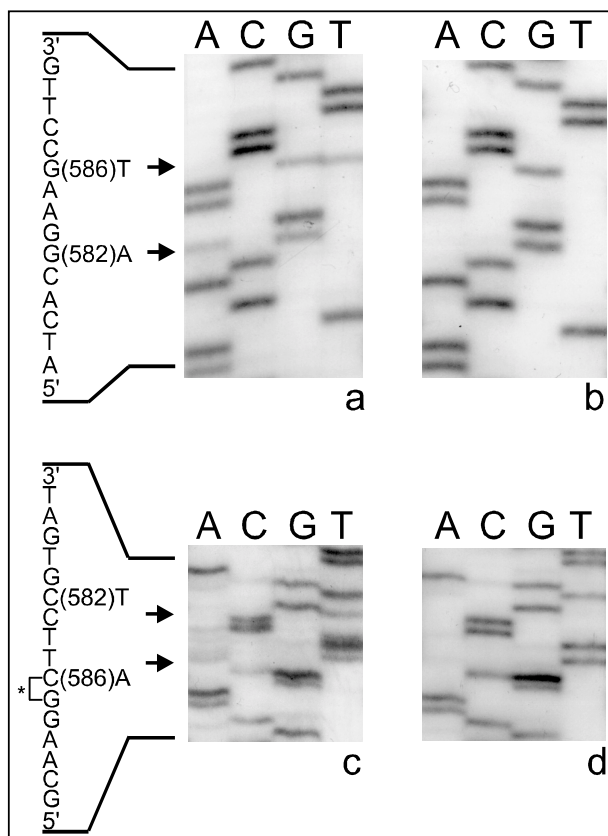
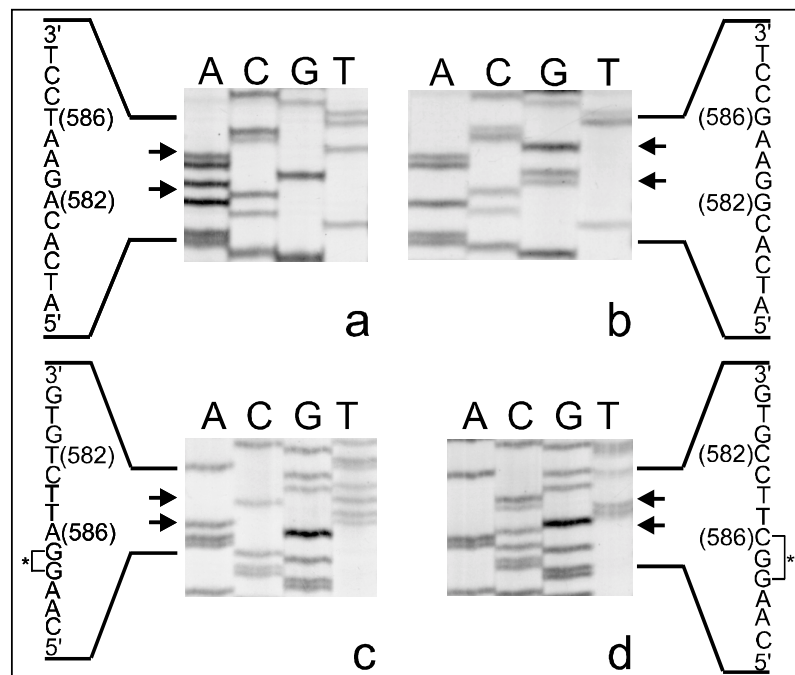


Abb. 5-14 FAMILIE 9. Sequenz des Indexpatienten von GCH 5.1 mit Strang (a), Gegenstrang (c) sowie den entsprechenden Kontrollen (b) und (d). Die Pfeile markieren die Mutationen. * ist eine Kompression, die auch bei der Kontrolle vorhanden ist.

Abb. 5-15 FAMILIE 9. T7-Sequenz des Indexpatienten von GCH 5.1 mit Strang (a), Gegenstrang (c) und den jeweiligen Kontrollen (b) und (d). Die Pfeile markieren die Mutationen bzw. die entsprechenden Positionen der Kontrolle. * ist eine Kompression, die auch beim Wildtypen vorhanden ist. Beide Mutationen befinden sich auf einem Chromosom.



FAMILIEN 6 und 12 G607A, Gly203Arg

Bei den SSCP-Analysen von GCH 5.1 dieser beiden Familien erschien jeweils ein „band shift“ bei den beiden Indexpatientinnen (Abb. 5-16 und Abb. 5-17). Da diese Bandenverschiebung bei den anderen Familienmitgliedern in beiden Familien nicht zu finden war, muß es sich um zwei sporadische Mutationen handeln.

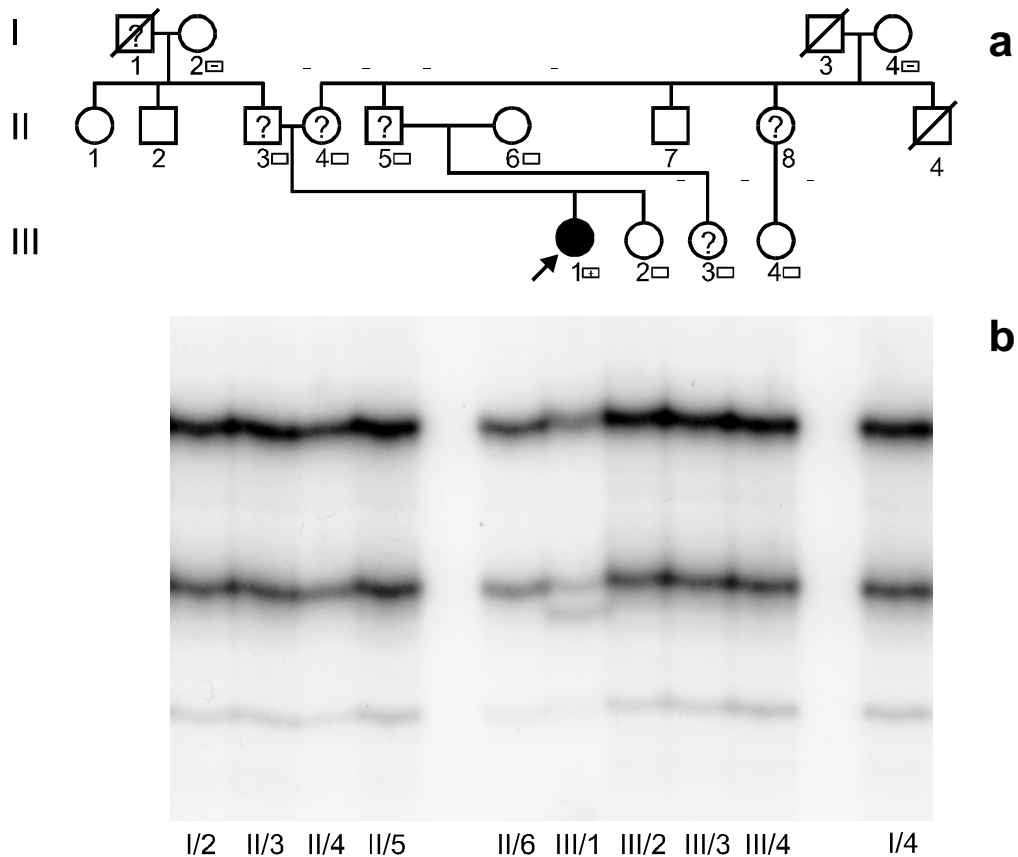


Abb. 5-16 FAMILIE 6. Stammbaum (a) und SSCP von GCH 5.1 (b). Der Pfeil markiert die Indexpatientin III/1, deren Analyse einen deutlichen „band shift“ zeigt. Alle weiteren Familienmitglieder entsprechen dem Wildtyp.

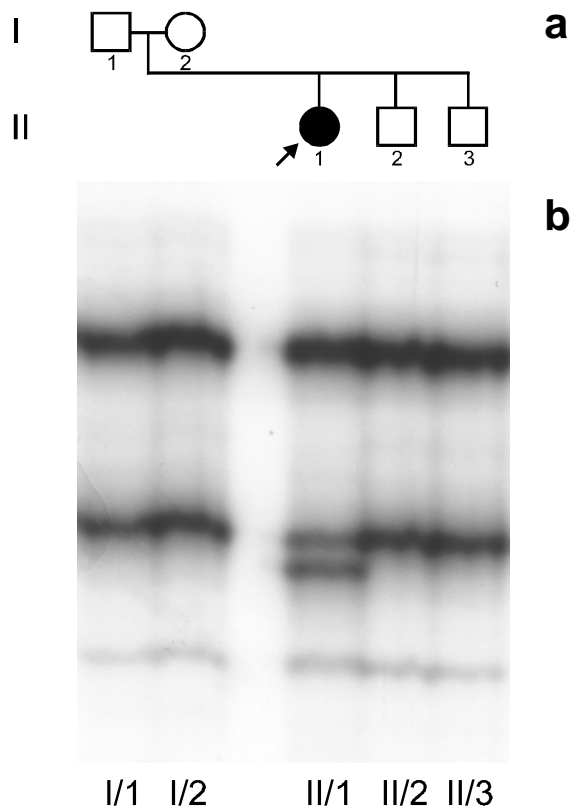


Abb. 5-17 FAMILIE 12. Stammbaum (a) und SSCP von GCH 5.1 (b). Auch hier zeigt die Indexpatientin II/1 (Pfeil) den einzigen „band shift“ der Familie.

Bei der zyklischen Sequenzierung in diesem Genabschnitt wurde bei beiden Indexpatientinnen die gleiche Punktmutation gefunden (Abb. 5-18). Es handelt sich um eine zuerst von Bandmann et al. [3] beschriebene Transition von G zu A an der Position 607 im Exon 5. Dies führt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins durch Ersatz von Glycin durch Arginin.

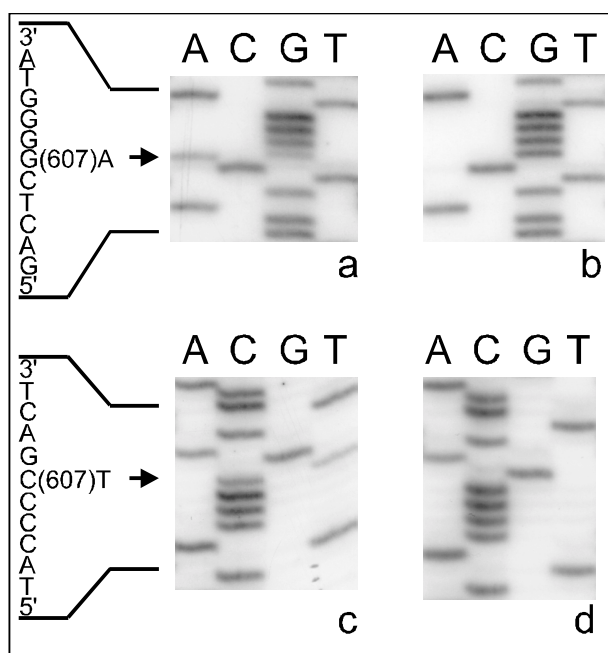


Abb. 5-18 FAMILIE 12. Sequenz der Indexpatientin von GCH 5.1 mit Strang (a) und Gegenstrang (c). (b) und (d) sind die entsprechenden Kontrollen. Exakt die gleiche Mutation fand sich auch bei der Indexpatientin von Familie 6.

5.1.5 Familien ohne Mutation im GTP-Cyclohydrolase I-Gen

Bei den übrigen Familien (1, 3, 5, 8, 10, 11, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) konnten im Rahmen dieser Arbeit weder durch SSCP-Analysen noch durch Sequenzieren aller sechs Exone von *GCHI* eine Mutation in diesem Gen gefunden werden.

Auch die bei der idiopathischen Torsionsdystonie vorkommende Mutation im TorsinA-Gen wurde nicht nachgewiesen.

5.2 Untersuchungen der Vaterschaft mittels polymorphen Mikrosatelliten-Markern (Short Tandem Repeat Polymorphism (STRP) Analyses)

Bei den Familien 2, 6 und 12 wurden jeweils Neumutationen nachgewiesen, mit der Besonderheit, daß in Familie 6 und 12 die gleiche Neumutation aufgetreten ist.

Um nachzuweisen, daß es sich bei den untersuchten Elternteilen um die leiblichen Eltern handelt, wurde bei allen drei Familien eine STRP-Untersuchung an die Mutationsanalyse angeschlossen.

Als hochpolymorphe Marker dienten die Loci D5S2360 mit 19 Allelen, D18S51 mit 15 Allelen, D21S11 mit 18 Allelen, D19S253 mit 10 Allelen, HUMFIBRA (FGA) mit 20 Allelen, HUMVWFA31/A (VWA) mit 12 Allelen sowie der X/Y Marker Amelogenin (AMEL). Die Primer und die dazugehörigen „Thermocycler“-Programme sind der Tabelle 3-3 in Kapitel 3.3.3 zu entnehmen.

Die Abbildungen 5-19 bis 5-21 zeigen jeweils vier polymorphe Marker und einen zum Nachweis der Chromosomen X und Y. Der Auftrag erfolgte bei jeder der Familien in der Reihenfolge Vater, Mutter, Tochter. In allen Familien ist zu erkennen, daß bei den polymorphen Markern die Töchter je ein Allel von Vater und Mutter haben, in manchen Fällen sind sie homozygot (Abb. 5-20 c, 5-21 e).

Unter Einbeziehung der Anzahl der möglichen Allele ist damit für jede der Familien die Vaterschaft mit hoher Wahrscheinlichkeit bewiesen.

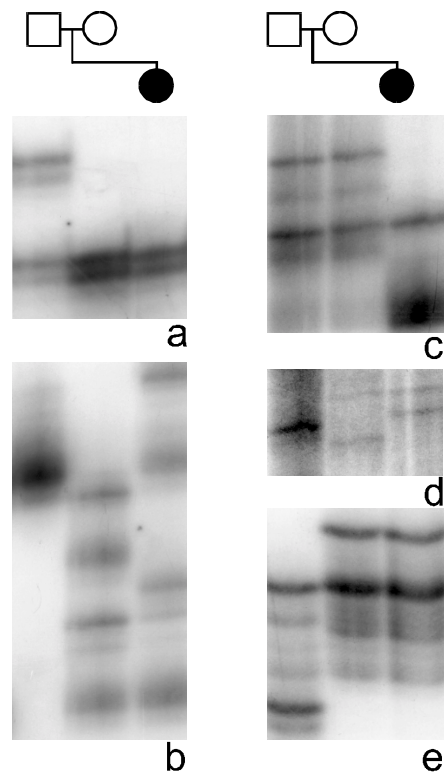
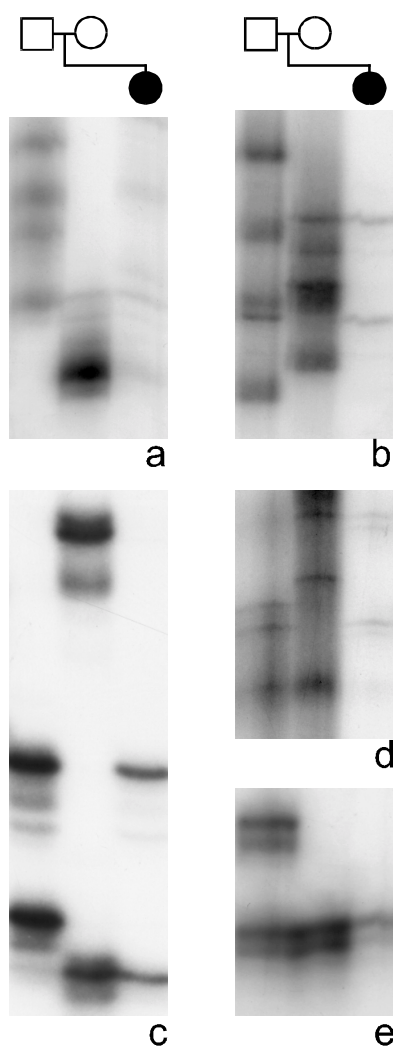


Abb. 5-20 FAMILIE 12. STRP-Analysen. a) AMEL, b) FGA, c) D21S11, d) D18S51, e) D5S2360

Abb. 5-19 FAMILIE 6. STRP-Analysen. a) FGA, b) D19S253, c) D5S2360, d) D18S51, e) AMEL

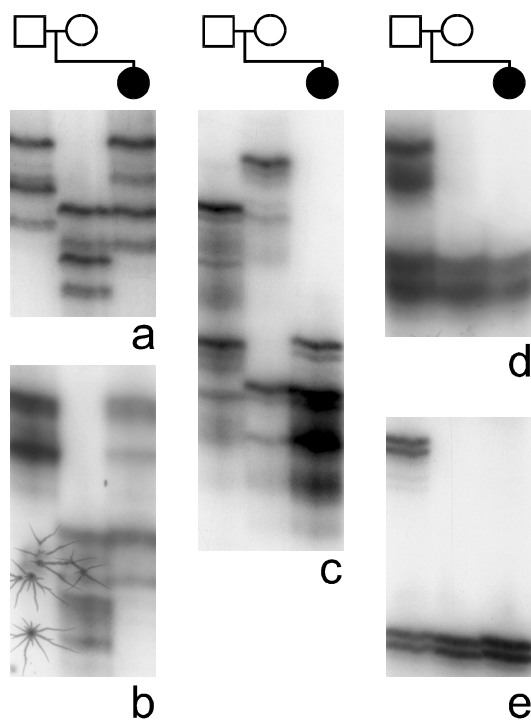


Abb. 5-21 FAMILIE 2. STRP-Analysen. a) D18S51, b) VWA, c) FGA, d) AMEL, e) D19S253

5.3 Molekulargenetische Untersuchungen am Gen der idiopathischen Torsionsdystonie (TorsinA-Gen)

Da die klinischen Symptome der Dopa-responsiven Dystonie denen der idiopathischen Torsionsdystonie (ITD) gleichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit nach Abschluß der Untersuchungen am *GCHI*-Gen alle Indexpatienten auf das bei der ITD mutierte Gen auf Chromosom 9q34 (*DYT1*) untersucht (siehe auch Kapitel 1.3).

Als einzige Mutation wurde bisher eine Deletion der Basen GAG (Abb. 5.22) im Bereich der für ein ATP-bindendes Protein namens TorsinA codierenden Sequenz identifiziert [92].

Es wurde eine zyklische Sequenzierung mit dem Primer DYT1 A (siehe Tabelle 3-1, Kapitel 3.3.3) mit allen Proben der Indexpatienten durchgeführt. In dem kritischen Bereich konnte in keinem der Fälle oben genannte Deletion festgestellt werden und somit eine Mutation in dem bei der ITD veränderten Gen bei allen untersuchten Familien ausgeschlossen werden.

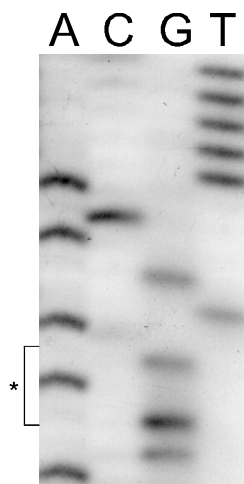


Abb. 5-22 Ausschnitt aus *DYT1*-Locus. Die mit * gekennzeichnete Klammer umfaßt die drei bei der Mutation deletierten Basen GAG.

6 Diskussion

6.1 Mutationen im GTP-Cyclohydrolase I-Gen (*GCHI*)

Die GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) katalysiert die erste und geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Tetrahydrobiopterin-Synthese aus Guanosintriphosphat. Tetrahydrobiopterin (BH₄) wiederum ist essentieller Cofaktor der Monooxygenasen der drei aromatischen Aminosäuren (Tyrosinhydroxylase, Tryptophanhydroxylase und Phenylalaninhydroxylase) und der Stickstoffmonoxid-Synthase (siehe auch Abb. 6-1).

Defekte der GTPCH I wurden erstmals 1984 im Zusammenhang mit der atypischen Hyperphenylalaninämie (HPA) von Niederwieser et al. beschrieben [78]. Erste Mutationen im Gen der GTPCH I (*GCHI*) auf Chromosom 14q22 wurden 1994 von Ichinose et al. [48] bei japanischen Patienten mit Dopa-responsiver Dystonie (DRD) veröffentlicht. Das Gen *GCHI* umfaßt ~30 kb, während die codierende Sequenz aus 750 Nukleotiden besteht (siehe Anhang). Inzwischen wurden mehr als 70 verschiedene heterozygote Mutationen im *GCHI*-Gen bei DRD-Patienten entdeckt sowie einige autosomal-rezessiv vererbte bei HPA-Patienten [50]. Außerdem konnten Hwu et al. 1999 eine homozygote Mutation im *GCHI*-Gen bei DRD nachweisen [46]. Einen Überblick über die zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit (Juni 2001) veröffentlichten Mutationen in dem für GTPCH I codierenden Gen gibt die Tabelle 7-2 im Anhang.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei neun der 24 untersuchten Familien acht verschiedene Mutationen im *GCHI*-Gen aufgedeckt werden. Dabei handelt es sich um drei Splice site- und drei Missense-Mutationen sowie um je eine Nonsense- und stumme Mutation (siehe Tabelle 6-1).

Tabelle 6-1 Mutationen dieser Promotionsarbeit

Genlocus	Mutation	Nukleotide	Effekt	FAMILIE
Exon 1	Transition C68T, dominant ⁺	CCC→CTC	Pro23Leu	15
Exon 1	Transversion C225A, dominant	TAC→TAA	Tyr75Stop	4
Intron 4	Transversion g(+1)c, sporadisch	Splice site Mutation	?	2
Intron 4	Transversion a(-2)c, dominant	Splice site Mutation	?	16
Exon 5	Transition G582A, Vererbung n. b.	ACG→ACA	stumme Mutation	9
Exon 5	Transversion G586T, Vererbung n. b.	GCC→TCC	Ala196Ser	9
Exon 5	Transition G607A, sporadisch *	GGG→AGG	Gly203Arg	6, 12
Intron 5	Insertion (+3)ins t, Vererbung n. b.	Splice site Mutation	?	7, 14

bereits vorbeschrieben in [3]*, [20, 55]*

Bemerkenswert ist, daß die Transition von C zu T in Exon 1 an Position 68 bereits zweimal veröffentlicht wurde [20,55]. Auch die Transition von G zu A in Exon 5 an Position 607 (G607A), die zu einem Aminosäurenaustausch von Glycin zu Arginin an Position 203 des Proteins führt, trat in den FAMILIEN 6 und 12 sporadisch auf. Diese Mutation wurde schon von Bandmann et al. 1996 [3] und 1998 [4] bei nicht verwandten Familien beschrieben. Möglicherweise sind diese beiden Positionen der Nukleotidsequenz Orte häufiger Spontanmutationen.

Vergleicht man die Krankengeschichten der beiden Patientinnen mit der G607A-Mutation fällt auf, daß der Beginn der jeweils beinbetonten Symptomatik im frühen Kleinkindesalter liegt, der Verlauf jedoch bei unterschiedlich langer Dauer bis zum Beginn der L-Dopa Therapie variiert. Beide Patienten sind durch die medikamentöse Behandlung bzgl. dystoner Symptomatik beschwerdefrei. Während die Patientin II/1 in FAMILIE 12 als einziges Familienmitglied eine dystone Symptomatik zeigte, fielen in FAMILIE 6 vier Probanden sowohl mütterlicher- als auch väterlicherseits durch dystone Minimalsymptome beim Schreibtest auf, drei Familienmitglieder hatten anamnestisch Zittern der Hände seit dem Jugendalter und drei Personen wurden orthopädisch operativ oder konservativ behandelt. Es war daher sehr überraschend, bei der Mutationsanalyse eine Neumutation zu entdecken. Im codierenden Bereich und den angrenzenden Intronbereichen von *GCHI* waren bei den Eltern der Mutationsträgerin durch SSCP-Analyse jedoch keine weiteren Mutationen zu finden. Möglicherweise gibt es in den Familien der Eltern noch weitere Mutationen auf anderen Genen im Dopa-Stoffwechsel oder im nicht-codierenden Bereich von *GCHI*.

Die Transversion C225A in Exon 1 der FAMILIE 4 führt zu einem Stop-Codon (Nonsense-Mutation), damit sehr wahrscheinlich zu einem Abbruch der Aminosäurekette an Position 75 und so zu einem stark verkürzten Protein.

Die Punktmutation von g zu c an der Position +1 der Splice donor site im Intron 4 führt sehr wahrscheinlich analog zu den von Hirano et al. [42, 44] und Bandmann et al. [4] beschriebenen Mutationen in Intron 2 und 5 zur Deletion des davorliegenden Exons, also des Exon 4, da keine neue „Splice donor site“ im angrenzenden Intronbereich entsteht. Damit würde das mutierte Genprodukt um 32 bp verkürzt sein und vermutlich zu einem Frameshift in den beiden nachfolgenden Exonen führen.

Die Punktmutation von a zu c an der Position -2 der „Splice acceptor site“ im Intron 4 führt vermutlich ebenso wie die von Weber et al. 1997 [127] und Furukawa et al. 1996 [36]

beschriebenen Mutationen zu einer Deletion des darauffolgenden Exon, also des 86 bp langen Exon 5.

Die Mutationen g(+1)c und a(-2)c sind die ersten für das Intron 4 beschriebenen Mutationen.

Eine Insertion an der Position +3 der „Splice donor site“ wie bei der Mutation +3 ins t im Intron 5 existiert in der Literatur noch nicht. Es ist jedoch davon auszugehen, daß diese Mutation zu einer deutlichen Veränderung des Enzyms führt und kein Polymorphismus ist, da sie bei zwei soweit bekannt nicht verwandten DRD-Patientinnen nachgewiesen und bei 150 unabhängigen Kontrollen durch SSCP-Analyse ausgeschlossen werden konnte. Am wahrscheinlichsten ist auch hier eine Deletion des vorangehenden Exon 5, da keine neue „Splice donor site“ entsteht.

Um die Veränderungen, die durch die oben genannten Spleißstellen-Mutationen entstehen, nachzuweisen, müßte die Genexpression auf der Stufe der mRNA untersucht werden. Dazu könnte man die RNA aus frischem Vollblut extrahieren und über eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) die cDNA herstellen, die wiederum vervielfältigt und sequenziert werden kann.

Erstmals wurde im Rahmen dieser Arbeit mutiertes *GCHI* bei einem Patienten mit oromandibulärer Dystonie mit Beginn im Alter von 46 Jahren diagnostiziert.

Solche fokale Dystonien sind häufig sporadisch, während jedoch 25 % der Erkrankten eine positive Familienanamnese aufweisen. Durch Kopplungsanalysen konnten Leube et al. [62, 63] 1996 und 1997 den kurzen Arm von Chromosom 18 als einen Krankheits-Locus (*DYT7*) für die idiopathische fokale Dystonie (IFD) in Europa identifizieren.

Wegen des hier erbrachten Nachweises einer *GCHI*-Mutation bei einem Patienten mit fokaler Dystonie und Beginn im Erwachsenenalter sollte die Differentialdiagnose der Dopa-responsiven Dystonie auch bei anderen Patienten mit fokaler Dystonie erwogen werden, da sich durch die L-Dopa-Medikation für einige dieser Patienten neue therapeutische Möglichkeiten ergeben.

Der Patient der FAMILIE 9, dessen Vater als Kind auch seltsame Gesichtsbewegungen gehabt habe, ist wohl einer der wenigen, die aufgrund der molekulargenetischen Diagnostik mit L-Dopa therapiert werden. Die medikamentöse Therapie sprach prompt an und führte zu einer deutlichen, wenn auch nicht kompletten Verbesserung der Symptomatik.

Dieser Patient ist nach derzeitigem Stand auch der einzige mit zwei benachbarten Mutationen in *GCHI* auf einem Chromosom, wie es durch T7-Sequenzierung nachgewiesen werden konnte. Ob der eine Basenaustausch ein bedeutungsloser Polymorphismus ist, welcher bei 150 nicht-verwandten Kontrollen nicht nachgewiesen werden konnte, oder ob durch diese Veränderung eine neue „Splice site“ entsteht wie von Richard et al. [97] beschrieben, bleibt offen.

Auffällig ist, daß mit drei Spleißstellen-Mutationen im Bereich von *GCHI* im Vergleich zu fünf Mutationen innerhalb der Exone im Rahmen dieser Arbeit ein recht hoher Anteil an Intron-Mutationen entdeckt wurde. Möglicherweise führen die Splice site-Mutationen durch den Wegfall größerer Aminosäurenabschnitte häufiger zu einer funktionellen Veränderung des Proteins, so daß es bereits bei Heterozygotie zu einer Erkrankung kommen kann.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchungen an durch Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten Monozyten durchgeführt wurden, wie sie zum Beispiel durch Ichinose et al. 1994 [48] beschrieben wurden, können keine Aussagen zur Enzymaktivität bei den einzelnen Patienten gemacht werden. Bei den gefundenen Veränderungen handelt es sich jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit um die molekularen Defekte, die für die klinische Symptomatik verantwortlich sind. In den bisher vorliegenden Daten ist die Aktivität der GTPCH I bei den DRD-Patienten mit Mutation im *GCHI*-Gen auf 2-20 % - und nicht wie zu erwarten auf 50 % - gegenüber Kontrollen reduziert [48]. Aber nicht jede Mutation führt automatisch zu einer solch drastischen Senkung der Enzymaktivität, die durch den sogenannten „dominant-negativen Effekt“ hervorgerufen wird (siehe Kapitel 6.2).

Schließlich gibt es eine weitere Erkrankung, die mit Mutationen im Gen *GCHI* einhergeht – die atypische Hyperphenylalaninämie (HPA) mit autosomal-rezessivem Erbgang. Die atypische HPA wird im Gegensatz zur klassischen Phenylketonurie (PKU) nicht durch autosomal-rezessive Veränderungen des Gens für die Phenylalaninhydroxylase verursacht, sondern durch ebenfalls autosomal-rezessive Veränderungen im Tetrahydrobiopterin-Stoffwechsel – unter anderem Mutationen beider Allele von *GCHI* - führt dadurch zu schwerem BH₄-Mangel und ist nicht durch alleinige phenylalaninarme Diät zu therapieren. Die schwere klinische Symptomatik (infantiles Parkinson-Syndrom, Opsoklonus, Dystonien, Dyskinesien, Myoklonien, therapieresistente Epilepsie ab dem frühen Säuglingsalter) wird weniger durch die oft nicht sehr stark erhöhten Phenylalaninspiegel, sondern

durch den Neurotransmittermangel (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin, Melatonin und vermutlich auch NO) im ZNS hervorgerufen. Die Therapie besteht daher in der Substitution der Neurotransmittervorstufen L-Dopa und 5-Hydroxytryptophan und manchmal in zusätzlichen oralen Gaben von Tetrahydrobiopterin (BH₄). Die Eltern der Betroffenen sind dann heterozygot für diese Mutation und in aller Regel völlig asymptomatisch [120].

Hirano et al. [44] nahmen aufgrund einer Untersuchung der GTPCH I-Aktivität an mit *GCHI* cDNA transfektierten COS-7 Zellen an, daß die Enzymaktivität bei einem heterozygoten Genträger einer *GCHI*-Mutation eines HPA-Patienten mindestens 50 % der normalen Aktivität beträgt.

6.2 GTP-Cyclohydrolase I-Mangel

Wie in Kapitel 6.1 beschrieben existiert ein Mangel des Enzyms GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) bei den Erkrankungen atypische Hyperphenylalaninämie (HPA) und Dopa-responsive Dystonie (DRD). Meistens wird erstere autosomal-rezessiv und letztere autosomal-dominant vererbt, wobei bei der DRD inzwischen mehrere compound-heterozygote Vererbungen [4, 34, 55] sowie ein homozygoter Fall [46] bekannt wurden.

Welche der Mutationen nun HPA und welche DRD auslösen können, hängt vermutlich von der Restaktivität der GTPCH I ab. Es ist sehr wahrscheinlich, daß ein sehr schwerer GTPCH I-Mangel HPA auslöst, während ein milderer GTPCH I-Mangel zur DRD führt [46]. Da die verschiedenen Methoden der Enzymaktivitätsmessung nicht miteinander vergleichbar sind, können nur grob geschätzte Werte angegeben werden.

Aufgrund einzelner Experimente wird vermutet, daß eine autosomal-dominante DRD ausgelöst wird, wenn das mutierte Enzym das Wildtyp-Enzym inhibiert und so eine Restaktivität von weit weniger als 50 % (2-20 % in [48]) resultiert. Dies bezeichnet man als „dominant“-negativen Effekt. [43]

Zwei Untersuchungen konnten zeigen, daß die Mutationen der Konduktoren bei rezessiver DRD keine Auswirkung auf die Aktivität des mutierten Enzyms hat [46] oder keine inhibierende Wirkung auf den Wildtyp besteht [43], so daß die Restaktivität mindestens 50 % beträgt.

Bei dem bisher einzigen veröffentlichten Fall mit homozygoter autosomal-rezessiver DRD [46], liegt die Veränderung am C-terminalen Ende des Proteins, welches normale Enzym-

aktivität aufweist. Allerdings führt diese R259S Mutation zu einer verminderten Enzymkonzentration. Hwu et al. folgerten, daß es sich um eine destabilisierende Mutation handeln müsse.

Die meisten homozygoten Mutationen in *GCHI* führen jedoch zu einem ausgeprägten GTPCH I-Mangel bis zu nicht nachweisbarer GTPCH I-Aktivität und BH₄-Konzentration [72] und damit zur autosomal-rezessiv vererbten atypischen Hyperphenylalaninämie [4, 10, 49].

Auch durch compound-Heterozygotie entsteht ein autosomal-rezessiver Erbgang, bei dem jedes Allel eine andere Mutation trägt. Bisher wurden nur DRD-Patienten mit solchen Mutationen beschrieben [4, 34, 55], allerdings konnte Furukawa bei zwei DRD-Patienten mit schwerem motorischen Entwicklungsrückstand je zwei durch die Eltern vererbte Mutationen nachweisen und zeigen, daß die BH₄-Spiegel im Liquor gegenüber denen bei klassischer DRD erniedrigt waren. Einer der Patienten profitierte sogar von zusätzlicher Therapie mit Tetrahydrobiopterin [34]. Damit sind die Grenzen zwischen klassischer DRD und milder Form der atypischen Hyperphenylalaninämie eher fließend.

So muß man auch diskutieren, ob Depressionen, Aggressionen und Schlafstörungen, wie sie bei manchen DRD-Patienten vorkommen (Patientin III/3 aus FAMILIE 5, Patientin III/1 aus FAMILIE 6), nicht auch durch einen Serotoninmangel bedingt sind und diese Patienten von einer oralen Substitution der Vorstufe 5-Hydroxytryptophan bzw. von BH₄ profitieren könnten.

Warum der gemäßigte GTPCH I-Mangel eher nur zu einem Tyrosinhydroxylase-Mangel und damit zum Dopaminmangel in den nigrostriatalen Dopaminneuronen führt, während schwerer Mangel auch die anderen BH₄-abhängigen Reaktionen betrifft, wird derzeit erklärt anhand der *in vivo* gemessenen Michaeliskonstanten (K_m) der Enzyme mit Kofaktor BH₄. Demnach sind die K_m-Werte für Tyrosinhydroxylase \geq Tryptophanhydroxylase $>$ Phenylalaninhydroxylase $>$ Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase [72].

Dies zeigt, daß mit sinkender GTPCH I-Aktivität nach der Tyrosinhydroxylase als nächstes ein Mangel der Tryptophanhydroxylase zu erwarten ist, lange bevor es zu einer Hyperphenylalaninämie durch Mangel der Phenylalaninhydroxylase oder zu Störungen durch NO-Mangel kommt.

6.3 Weitere Störungen des Tetrahydrobiopterin-Stoffwechsels

Tetrahydrobiopterin ((6R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, BH₄) ist ein essentieller Cofaktor der drei Aminosäure-Monooxygenasen Tyrosinhydroxylase, Tryptophanhydroxylase und Phenylalaninhydroxylase sowie der Stickstoffmonoxid-Synthase. Die *de novo* Synthese von BH₄ erfolgt aus Guanosintriphosphat (GTP) über mehrere Zwischenprodukte, außerdem kann BH₄ wieder aus 4α-Hydroxytetrahydrobiopterin (4-OH-BH₄) regeneriert werden (Abb. 6-1). Die Dehydratation von 4-OH-BH₄ durch die Carbinolamin-Dehydratase erfolgt auch nicht-enzymatisch, dann aber sehr viel langsamer.

Im Rahmen der atypischen Hyperphenylalaninämie wurden bis jetzt vier Enzymdefekte, die zu einem BH₄-Mangel führen, beschrieben. Davon hatten mehr als die Hälfte der Patienten einen Mangel an 6-Pyruvoyltetrahydropterinsynthase (6PPH₄-Synthase), bei wenigen wurden GTPCH I- und Carbinolamin-Dehydratase-Mangel diagnostiziert, und die übrigen Patienten hatten einen Dihydropteridinreduktase-Mangel [96]. Mutationen, die zu diesen Enzymmangelsituationen führen, wurden für alle vier Enzyme beschrieben [19, 108, 120, 122]

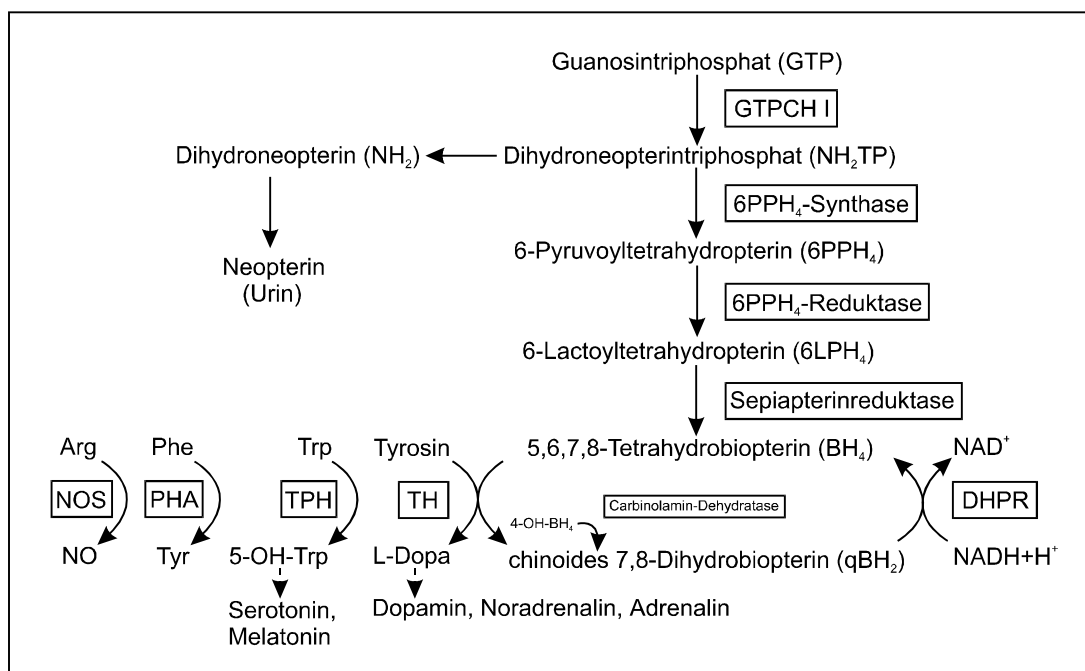


Abb. 6-1 Tetrahydrobiopterin-Stoffwechsel. GTPCH 1=GTP-Cyclohydrolase 1, 6PPH₄-Synthase=6-Pyruvoyltetrahydropterinsynthase, 6PPH₄-Reduktase=6-Pyruvoyltetrahydropterinreduktase, TH=Tyrosinhydroxylase, Trp=Tryptophan, TPH=Tryptophanhydroxylase, 5-OH-Trp=5-Hydroxytryptophan, Phe=Phenylalanin, PHA=Phenylalaninhydroxylase, Arg=Arginin, NOS=NO-Synthase, NO=Stickstoffmonoxid, 4-OH-BH₄=4α-Hydroxytetrahydrobiopterin, DHPR=Dihydrobiopterinreduktase

Da mit mutiertem *GCHI*-Gen bereits eine gemeinsame Ursache für HPA und DRD gefunden wurde, müssen auch die anderen Gene der bei HPA defekten Enzyme als Kandidatengene in Betracht gezogen werden. Diese sind:

1. das 6-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase-Gen auf Chromosom 11q22.3-q23.3
2. das Carbinolamin-Dehydratase-Gen
3. das Dihydrobiopterin-Reduktase-Gen

Denkbar sind auch Mutationen im Gen der 6-Pyruvoyltetrahydrobiopterin-Reduktase und der Sepiapterinreduktase (Chromosom 2p14-p12) [121], allerdings konnten bisher keine Defekte dieser beiden Enzyme nachgewiesen werden.

6.4 Penetranz und deren geschlechtsspezifische Unterschiede

Aufgrund der kleinen Fallzahl konnten im Rahmen dieser Arbeit nur wenig aussagekräftige Zahlen zur Penetranz ermittelt werden, zumal nur drei Familien, darunter zwei mit jeweils nur zwei Mutationsträgern, in die Berechnung eingehen. Die übrigen Mutationen sind Neumutationen oder es wurden weitere Familienmitglieder nicht untersucht.

So zeigten sich bei den hier untersuchten DRD-Familien 14 Frauen, zehn davon symptomatisch, und bei zwei symptomatischen Männern Mutationen im Gen der GTP-Cyclohydrolase I (*GCHI*). Das Verhältnis von Frauen zu Männern mit genetisch nachgewiesener DRD beträgt damit in dieser Arbeit 7:1 und entspricht so nicht der statistischen Verteilung. Bei den drei Familien mit mehr als einem Mutationsträger konnte eine Penetranz der Erkrankung von durchschnittlich 56 % (50 % bis 67 %) ermittelt werden. Die geschlechtsspezifische Penetranz beträgt hier für Frauen 71 % und für Männer 100 %. Damit können bisher veröffentlichte Zahlen [35, 113], wonach die Penetranz bei Frauen mit 87 % und 100 % deutlich höher als bei Männern ist (38 % und 55 %), anhand dieser Untersuchung leider nicht bestätigt werden.

Im folgenden soll darüber diskutiert werden, welche Faktoren in der Symptomentwicklung bei den Mutationsträgern eine Rolle spielen können.

Wie bereits in Kapitel 6.2 beschrieben, scheint die Ausprägung der neurologischen Symptomatik bei Mutationen in *GCHI* entscheidend von der Restaktivität der GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) abzuhängen. Ichinose et al. [48] untersuchten die Enzymaktivität in Monozyten und stellten fest, daß diese bei Patienten mit DRD auf weniger als 20 % redu-

ziert war, bei den asymptomatischen Mutationsträgern (beide männlich) hingegen nur auf 36 und 37 %. Außerdem war die Enzymaktivität bei Frauen insgesamt niedriger als bei Männern. Auch Messungen des Neopterin-Gehalts im Liquor, welcher die GTPCH I-Aktivität im Gehirn widerspiegeln soll, ergaben bei DRD-Patienten weniger als 20 % der Normwerte gegenüber 35 % bei asymptomatischen Mutationsträgern [117]. Der wesentlich größere Frauenanteil unter den DRD-Patienten (hier 5:1, 4.3:1 in [35], 2.5:1 in [113] führte u. a. zu Untersuchungen der *GCHI*-mRNA an Mäusen, die bei den männlichen Tieren wesentlich höhere Konzentrationen erreicht als bei den weiblichen [107]. Dies konnte jedoch an menschlichen Gehirnen bei Autopsien neurologisch gesunder Menschen bisher nur für Erwachsene bestätigt werden [32]. Bei kindlichen Gehirnen gibt es keinen signifikanten Geschlechtsunterschied, der für die höhere weibliche Prävalenz bei der meist im Kindesalter beginnenden Erkrankung als Erklärung dienen könnte. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß Furukawa et al. [34] bei einer Patientin eine Zunahme der Symptomatik nach Einnahme oraler Kontrazeptiva beobachteten. Hirano et al. [44] vermuteten deshalb ein Geschlechtshormon-sensitives Element in *GCHI*.

Bei zwei der hier untersuchten Patienten spielten auch Alkohol bei der Symptomatik (FAMILIE 4, III/6) bzw. eine Infektion bei dem Erkrankungsbeginn (FAMILIE 8, I/3) eine Rolle. Es ist schon lange bekannt, daß die GTPCH I-Aktivität von vielen Faktoren beeinflußt wird. So wird sie induziert durch zyklische AMP-erhöhende Reagenzien [131] oder Zytokine wie Interferon γ , Tumornekrosefaktor α und Kit-Liganden [128, 132], auch Phytohämagglutinin – welches man sich bei diagnostischen Zwecken zunutze macht [48] – und Phosphorylierung der GTPCH I führt zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms [41].

Da Altersabhängigkeit der klinischen Symptomatik offensichtlich ist – häufigster Altersbeginn mit Dystonie im Kindesalter, bei Erwachsenen eher Parkinsonismus – untersuchten Furukawa et al. menschliche Gehirne neurologisch Gesunder aller Altersgruppen. Dabei wurden im Kindesalter signifikant höhere, teils bis zum 13. Lebensjahr sogar ansteigende Biopterinspiegel im Putamen gefunden, die im Erwachsenenalter abfallen [32]. Mangel von Biopterin im Putamen kann damit für die Erkrankung von zuvor gesunden Erwachsenen als Erklärung dienen, deren Enzymaktivität im Kindesalter noch ausreichend war. Der häufige Beginn im Kindesalter ist möglicherweise damit zu erklären, daß die bei Gesunden gemessenen physiologisch im Kindesalter erhöhten Biopterinspiegel durch mutiertes *GCHI* nicht erreicht werden können und so zur klinischen Symptomatik führen, die manchmal während der Pubertät wieder verschwindet [117].

6.5 Familien ohne Mutation im GTP-Cyclohydrolase I-Gen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei 13 der insgesamt 22 Familien (59 %) mit klinischem Verdacht auf Dopa-responsive Dystonie keine Mutationen in den sechs Exons und den angrenzenden Exon-Intron-Grenzen von *GCHI* detektiert werden. Der prozentuale Anteil der Patienten ohne Mutation in *GCHI* liegt damit deutlich höher als die von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen 40 % [33, 53, 89, 115].

Dies kann vor allem daran liegen, daß einige Familien ohne typische DRD-Symptomatik in diese Studie aufgenommen wurden, u. a. weil der genaue klinische Verlauf erst später bekannt wurde. So zeigten die FAMILIEN 8, 17, 18 einen nachlassenden therapeutischen Effekt von L-Dopa und eine medikamentöse Behandlung mit L-Dopa wurde bei FAMILIE 10 vor der molekulargenetischen Untersuchung noch nicht versucht. Bei diesen vier Familien tritt Parkinsonismus in teilweise ausgeprägter Form bei mindestens einem Mitglied auf, so daß bei diesen Familien auch durchaus ein juveniler oder idiopathischer M. Parkinson als Diagnose in Frage kommen.

Trotzdem finden sich auch in dieser Studie zahlreiche sehr typische DRD-Patienten, die keine Mutationen in der codierenden Region von *GCHI* aufweisen. Geht man davon aus, daß einige dieser DRD-Patienten einen GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I)-Mangel haben, was bei keinem dieser Patienten untersucht wurde, aber durch Messung der GTPCH I-Aktivität in Monozyten direkt [48, 115] oder durch Analysen im Liquor indirekt möglich ist (siehe Kapitel 6.9), so muß sowohl nach möglichen Fehlerquellen der Genanalyse als auch nach weiteren möglichen Bereichen des Gens außerhalb des codierenden Bereichs inklusive Spleißstellen gesucht werden. Inagaki et al. [53] konnten ein inaktives Allel nachweisen, obwohl keine Mutation in *GCHI* gefunden wurde.

Zur molekulargenetischen Analyse von *GCHI* wurden in dieser Arbeit zunächst alle sechs Exons mittels PCR amplifiziert und per SSCP-Analyse „gescreent“. Ließen sich so Bandenverschiebungen („band shifts“) nachweisen, wurde eine Sequenzierung des betroffenen Gens vorgenommen. Auf diese Weise wurden alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Mutationen detektiert.

Da allerdings die Sensitivität der SSCP-Analyse bei den geringsten Abänderungen der Elektrophoresebedingungen erheblichen Schwankungen unterliegt (35-90 % nach Sakar et

al. [100]) und vor allem von der Produktgröße abhängt – 75-95 % bei 187 bp gegenüber 59 % bei 307 bp – wurden für diese Studie möglichst kleine Fragmente im Bereich von 176-237 bp amplifiziert und die Elektrophoresebedingungen durch kommerzielle SSCP-Gele und stabile Temperaturen im Kühlraum optimiert. Um möglichst alle Mutationen in *GCHI* zu erfassen, wurden für diese Arbeit zusätzlich alle Indexpatienten ohne nachgewiesene Mutation in allen sechs Exonen sequenziert.

Ferner können sehr große Deletionen des *GCHI*-Gens nicht mit der herkömmlichen Sequenzierung erfaßt werden. Furukawa et al. [31] beschrieben eine große heterozygote Deletion bei sechs Mitgliedern einer Familie mit DRD in drei Generationen, die nur durch Sequenzierung der cDNA zur erkennen war und empfehlen, diese Untersuchung bei allen mutationsnegativen DRD-Patienten mit autosomal-dominantem Erbgang zum Ausschluß einer solch großen Deletion durchzuführen.

Weitere Mutationen, die zu einem GTPCH I-Mangel führen können, sind in den nicht codierenden Regulatorregionen (5', 3' und intronisch) zu suchen, die bei diesen 22 Familien noch nicht untersucht wurden. Bandmann et al. [4] berichteten 1998 erstmals von zwei Mutationen im nicht codierenden Bereich 5'-Bereich („5'-untranslated region“, 5'-UTR) bei einem Patienten mit DRD. Bisher ist jedoch nichts bekannt über die funktionelle Relevanz der 5'-UTR von *GCHI*, insbesondere dieser Mutationen, es ist jedoch davon auszugehen, daß diese Region ebenso wie bei anderen Genen wichtige Funktionen der Genexpression übernimmt und Mutationen in diesem Bereich diese demzufolge schädigen können.

Desweiteren ist es möglich, daß Mutationen in Regulatorgenen auf anderen Chromosomen Einfluß auf die Expression von *GCHI* haben. Bisher ist aber kein solches Regulatorgen für *GCHI* bekannt. Außerdem müssen auch Gene, die die Aktivität von Tetrahydrobiopterin beeinflussen in die diagnostischen Überlegungen einbezogen werden (siehe Kapitel 6.3 und 6.4).

Bei Patienten ohne Mutation in *GCHI*, ohne Kopplung auf Chromosom 14q22 und ohne GTPCH I-Mangel müssen neben anderen Gendefekten im Tetrahydrobiopterin-Stoffwechsel (siehe Kapitel 6.3) noch weitere Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden.

Zunächst ist in diesem Zusammenhang an die idiopathische Torsionsdystonie zu denken, bei der das Krankheitsgen identifiziert wurde (siehe Kapitel 6.6).

Bei möglichem autosomal-rezessiven Erbgang sollte sich eine Untersuchung des Tyrosinhydroxylase-Gens anschließen, da homozygote oder compound-heterozygote Mutationen in diesem Gen für die autosomal-rezessive DRD verantwortlich sind (siehe Kapitel 6.7).

Treten auch parkinsonoide Symptome zusätzlich zur Dystonie auf, muß auch die Diagnose eines juvenilen Parkinson-Syndroms erwogen werden. Das Gen für die autosomal-rezessive Form ist bekannt (Parkin-Gen) und Mutationsanalysen führten bereits in wenigen Fällen zur Diagnose bei vorher angenommener DRD (siehe Kapitel 6.8).

Sicherlich kommen auch noch weitere Erkrankungen des dystonen Formenkreises als Differentialdiagnose in Betracht, die allerdings um so weniger wahrscheinlich sind, je strikter die Kriterien bei der Diagnosestellung der DRD von Segawa und Nygaard [81] eingehalten werden.

6.6 Mutationen im TorsinA-Gen

Das bei der idiopathischen Torsionsdystonie (ITD) mutierte Gen auf Chromosom 9q34 (*DYT1*) hat ein offenes Leseraster von 998 bp und codiert für ein ATP-bindendes Protein, TorsinA mit 332 Aminosäuren. Als häufigste Mutation konnte eine rasterkonforme Trinukleotid-(GAG)-Deletion in Exon 5 an Position 946-948 der Nukleotidsequenz bei ca. 75 % der Patienten mit ITD nachgewiesen werden [92]; als einzige weitere Mutation wurde erst 2001 eine Deletion von 18 Basenpaaren im gleichen Exon nachgewiesen [18a].

Wie auch von Bandmann et. al 1998 [4] wurden im Rahmen dieser Arbeit die Indexpatienten auf diese Mutation durch Sequenzierung untersucht. Dabei konnte bei keiner der untersuchten DNA-Proben oben genannte Deletion festgestellt werden.

Eine zusätzliche Mutation in *DYT1* bei bereits nachgewiesener Mutation in *GCH1* wäre sehr unwahrscheinlich gewesen, so daß das negative Ergebnis in den neun Familien (2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 16) mit hier nachgewiesener Mutation im *GCH1*-Gen zu erwarten war.

Definitionsgemäß unterscheidet sich die ITD von der Dopa-responsiven Dystonie (DRD) in der Dopa-Responsivität. In-situ Hybridisierung in menschlichem Autopsiematerial zeigte eine starke Expression der TorsinA-mRNA in einigen Basalganglien inklusive der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra, so daß möglicherweise eine Funktionsstörung der Dopamintransmission für die ITD pathogenetisch von Bedeutung ist [2] und eine Therapie mit L-Dopa nicht erfolgreich sein kann. So war auch zu erwarten, daß die Pati-

enten, die Dopa-responsiv waren (FAMILIEN 1, 5, 11, 13, 21, 22), keine Mutation in *DYT1* aufwiesen.

Da im Rahmen dieser Arbeit auch keine Patienten mit typischer Dystonie ohne Dopa-Responsivität untersucht wurden, konnte auch bei den übrigen Patienten keine ITD molekulargenetisch nachgewiesen werden.

Daraus folgt, daß zwar bei Patienten mit DRD häufig die Fehldiagnose einer ITD gestellt wird, der umgekehrte Fall aber eher unwahrscheinlich ist [4].

6.7 Mutationen im Tyrosinhydroxylase-Gen

Die Tyrosinhydroxylase (TH) ist das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Biosynthese der Katecholamine (Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin). Das TH-Gen liegt im Chromosom 11p15.5 und besteht aus 14 Exonen. Nachdem 1990 erstmals von Görke und Bartholomé [37] eine autosomal-rezessive Form der Dopa-responsiven Dystonie (DRD) beschrieben wurde, konnten Lüdecke et al. 1995 [64] die erste homozygote Mutation im TH-Gen bei zwei Geschwistern mit typischer DRD-Symptomatik nachweisen. Die nachfolgend von Knappskog 1995 [58], Flatmark 1997 [28], van den Heuvel 1998 [126] und Bräutigam 1998 [14] beschriebenen Patienten mit homozygoter bzw. compound-heterozygoter Mutation im TH-Gen fielen eher durch leichte bis schwere motorische Retardierung mit Rumpfhypotonie, Hypokinesie und Parkinsonismus ab dem frühen Säuglingsalter (4.-7. Lebensmonat) als durch Dystonie auf, wobei alle Patienten sehr gut auf Therapie mit L-Dopa reagierten, so daß dieses Krankheitsbild auch als Dopa-responsiver Parkinsonismus bezeichnet wurde. Bisher wurde lediglich eine weitere TH-Mutation bei einem Patienten mit typischer DRD-Symptomatik entdeckt, der viele Jahre als spastische Paraparese fehldiagnostiziert war [30]. Die bisher nachgewiesenen Mutationen im TH-Gen sind in Tabelle 6-2 aufgelistet.

Wenn auch die meisten Patienten mit nachgewiesener *TH*-Mutation die Symptome eines infantilen Parkinsonismus aufweisen, so konnten immerhin bei drei Patienten die typischen DRD-Symptome auf Mutationen im TH-Gen zurückgeführt werden.

Deshalb ist es sicherlich sinnvoll bei rezessivem Erbgang oder scheinbar sporadischem Auftreten einer DRD eine Untersuchung des TH-Gens durchzuführen.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Familien ist eine Mutation in diesem Gen nur für die FAMILIEN 19-22 denkbar, da in den übrigen Familien ohne Mutation dystone

oder parkinsonoide Symptome in mehreren Generationen auftreten. Eine Krankheit durch Heterozygotie in *TH* wurde bisher nicht beschrieben.

Tabelle 6-2 Mutationen im Tyrosin-Hydroxylase-Gen bei autosomal-rezessiver DRD / Parkinsonismus

Leitsymptom	Genlocus	Mutation	Effekt	Quelle
(homozygot)				
typische DRD	Exon 11	C1141A	Gln381Lys	[58]
Parkinsonismus	Exon 5	T614C	Leu205Pro	[65]
Parkinsonismus	Exon 5	?	Arg302His	[28]
Parkinsonismus	Exon 6	G698A	Arg233His	[126]
Parkinsonismus	Exon 10	G1076C	Cys359Phe	[13]
(compound-heterozygot)				
Parkinsonismus	Exon 3/6	291delC/G698A	Leu205Ter/Arg233His	[14, 129]
Parkinsonismus	Exon6/Intron 11	G698A/a-24t	Arg233 His/Branch site Mutation	[54]
Parkinsonismus	Exon 9/14	G1010A/C1481T	Arg337His/Thr494Met	[116]
Parkinsonismus	Exon 8/9	A826C/C941T	Thr276Pro/Thr314Met	[116]
„Spastik“, DRD	Exon 3/14	296delT/A1493G	frameshift/Asp498Gly	[30]

6.8 Mutationen im Parkin-Gen: das juvenile Parkinson-Syndrom als mögliche Differentialdiagnose

Neben der Dopa-responsiven Dystonie (DRD) gibt es eine weitere Erkrankung, die durch Dystonie und Parkinsonismus in den ersten Lebensjahrzehnten gekennzeichnet ist: das idiopathische Parkinson-Syndrom mit Beginn vor dem 40. Lebensjahr („early-onset idiopathic parkinsonism“, EOIP). Eine Untergruppe davon bildet der juvenile Parkinson (JP) mit Beginn vor dem 21. Lebensjahr. Es wurde beobachtet, daß die EOIP-Patienten häufiger deutliche dystone Symptomatik und eine positive Familienanamnese aufweisen als Parkinson-Patienten mit späterem Beginn [109].

Wegen der sehr ähnlichen klinischen Symptomatik und dem guten Ansprechen auf medikamentöse Therapie mit L-Dopa ist die Differenzierung zwischen diesen beiden Erkrankungen sehr schwierig. Allerdings wurden bei Patienten mit EOIP häufig durch L-Dopa induzierte Dyskinesien und das „On-off“-Phänomen beobachtet [38], was lange Zeit als Unterscheidungskriterium zwischen beiden Erkrankungen galt [119]. Rajput et al. [95] führte diese Unterschiede darauf zurück, daß es bei der DRD im Gegensatz zum JP nicht zu einem Untergang der dopaminergen Zellen in der Substantia nigra kommt. So konnten

auch Olsson et al. [90] bei der Autopsie einer jungen Frau, bei der seit dem zwölften Lebensjahr eine DRD diagnostiziert war, Veränderungen passend zum JP in der Substantia nigra finden. Bei Langzeituntersuchungen an DRD-Patienten ergab sich in den meisten Fällen eine sehr gute Prognose, während einige Patienten einen Wirkungsverlust der L-Dopa-Therapie und verstärkte parkinsonoide Symptomatik entwickelten, so daß diese Patienten eher als fehldiagnostizierte JP-Patienten anzusehen waren [83]. Schließlich konnten Snow et al. 1993 [109] durch Positronenemissionstomographie (PET) mit Fluorodopa (FD) nachweisen, daß den beiden Erkrankungen unterschiedliche pathophysiologische Geschehen zugrunde liegen müssen, da die FD-Aufnahme im Striatum bei DRD-Patienten normal, bei EOIP-Patienten hingegen erniedrigt war.

Inzwischen konnte ein bei der autosomal-rezessiven Form des juvenilen Parkinsons mutiertes Gen (Parkin-Gen) entdeckt werden [57], das auf Chromosom 6q25.2-q27 lokalisiert ist. Es umfaßt mehr als 500 kb mit 12 Exons und 1395 Nukleotiden, die für 465 Aminosäuren codieren. Tassin et al. [119] untersuchten zehn Familien mit dem Phänotyp einer DRD, die keine Mutation im *GCHI*-Gen aufwiesen am Parkin-Gen. Davon hatten drei Familien mit insgesamt sieben Betroffenen Deletionen in diesem Gen, was wiederum aufzeigt, wie schwierig die Differentialdiagnose ist. Sechs der sieben Patienten hatten neben den parkinsonoiden Symptomen Rigor und Bradykinesie eine Dystonie (fokal oder generalisiert), die bei fünf dieser Patienten initiales Symptom war. Sechs dieser sieben Patienten hatten L-Dopa-induzierte Dyskinesien. Allerdings traten im Rahmen der gleichen Studie auch Dyskinesien bei Patienten mit nachgewiesener *GCHI*-Mutation auf.

Daher sollte bei allen DRD-Patienten mit vorhandener Parkinson-Symptomatik und möglichem autosomal-rezessivem Erbgang eine Mutationsanalyse des Parkin-Gens vorgenommen werden, da dies prognostisch von Bedeutung ist.

6.9 Weitere diagnostische Möglichkeiten bei Verdacht auf Dopa-responsive Dystonie

Sobald einmal der Verdacht auf eine Dopa-responsive Dystonie (DRD) geäußert wurde – die Kenntnis von Symptomen und Verlauf der Erkrankung ist für die frühzeitige Diagnosestellung von allergrößter Bedeutung und leider nur bei einem kleinen Teil der Ärzte vorhanden – stellt sich für den klinisch tätigen Arzt die Frage, welche diagnostischen Maßnahmen zur Diagnosesicherung durchgeführt werden sollten.

Die oben aufgeführten Mutationsanalysen in *GCHI*, *TH*, TorsinA- und Parkin-Gen sind sicherlich von großem Interesse für das Verständnis der Pathogenese der Dystonien, können in Einzelfällen durch Kenntnis des defekten Enzyms zu gezieltem therapeutischem Einsatz von zusätzlicher Medikation führen (z. B. BH₄, [21]) und sollten in jedem Falle angestrebt werden. In seltenen Fällen, wie auch bei FAMILIE 9, führt die genetische Analyse sogar zur initialen Therapie. Allerdings ist dieses Verfahren aufgrund der vielen verschiedenen Mutationen (außer bei *DYT1*) äußerst zeitaufwendig, so daß man den Therapiebeginn nicht bis zum Erhalt der Mutationsanalyse hinauszögern sollte. Zusätzlich zeigen ca. 40 % der klinisch gesicherten DRD-Patienten keine Mutationen in oben angegebenen Genen, so daß ein negatives Ergebnis die Erkrankung nicht ausschließen darf.

Ichinose et al. beschrieben eine verminderte Aktivität der GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) in Monozyten, die durch Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert wurden, bei DRD-Patienten mit gesicherter Mutation auf 2-20 % und bei Mutationsträgern auf 36-37 % [48]. Bezin et al. [8] wiederum vermuteten eine Verfälschung der Werte durch die PHA-Stimulation und schlugen eine Bestimmung des Neopterin, Nebenprodukt der GTPCH I-Reaktion, in nichtstimulierten Lymphoblasten als indirekte Messung der GTPCH I-Aktivität vor. Dies ist jedoch eine technisch sehr schwierige Methode [33] und zur Routinediagnostik wohl kaum geeignet. Eine Bestimmung der Enzymaktivität aus einem Leberbiopsat ist möglich [71], sollte jedoch aufgrund der schwerwiegenden Komplikationen mit Todesfällen für die Diagnosestellung der DRD obsolet sein. Da eine Bestimmung der Enzymaktivität aber von großer diagnostischer Bedeutung ist (reduzierte Aktivität trotz nicht detektierter Mutation in *GCHI*) wurde durch Bonafe et al. [11] mit einer Aktivitätsbestimmung in Cytokin-stimulierter Fibroblastenkultur ein weiterer diagnostischer Test für die DRD entwickelt. Auch diese Untersuchung ist durch die Hautbiopsie invasiv und sollte daher eher am Ende der diagnostischen Leiter stehen.

Ein oraler Phenylalanin-Belastungstest wurde von Hyland et al. entwickelt [47]. Dabei können Störungen des Phenylalanin- und Biopterin-Stoffwechsels relativ einfach anhand von mehrfachen Serumspiegelbestimmungen von Phenylalanin, Tyrosin und Biopterin aufgedeckt werden. Allerdings zeigten einige genetisch gesicherte DRD-Patienten keine pathologischen Werte in diesem Test [103].

Zuverlässige Aussagen über den Ort und die Auswirkungen des Stoffwechseldefekts kann man über die Analyse des Liquor cerebrospinalis erhalten [33]. Bei autosomal-dominanter DRD mit GTPCH I-Mangel sind Homovanillinsäure (HVS, Abbauprodukt von Dopa und Dopamin), Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Neopterin (pathognomonisch für GTPCH I-

Mangel) vermindert [26, 81, 117], während bei autosomal-rezessiver DRD mit Tyrosinhydroxylase-Mangel HVS und 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethylenglycol (Noradrenalin-metabolit) erniedrigt, die Pterine und die 5-Hydroxyindolessigsäure, die als Abbauprodukt des Serotonins bei allen Erkrankungen mit BH₄-Mangel erniedrigt ist [11], normal sind [14]. Theoretisch müßten diese Untersuchungen – wie bei der malignen Hyperphenylalaninämie mit BH₄-Mangel auch routinemäßig durchgeführt [74] – zumindest für den GTPCH I-Mangel aus Urin möglich sein. Dazu gibt es bisher keine Veröffentlichungen. Bei dem Tyrosinhydroxylase-Mangel führten Urinmessungen von HVS, Vanillinmandelsäure und Katecholaminen jedoch zu falsch-negativen Ergebnissen.

Differentialdiagnostisch von Bedeutung sind die [¹²³I]β-CIT Single-Photon Emission Tomography (SPECT) [73] und die 6-[¹⁸F]Fluorodopa-Positronenemissionstomographie (6-FD-PET) [85, 104, 109] zur klinisch nicht immer einfachen Abgrenzung des juvenilen Parkinsonismus von der DRD. Diese bildgebenden Methoden können die striatalen dopaminergen Neurone darstellen, die bei der DRD intakt, bei juvenilem Parkinson jedoch defekt sind.

Ein Therapieversuch mit L-Dopa ist jedoch noch immer das einfachste und meistens auch schnellste Verfahren, eine Dopa-responsive Dystonie zu diagnostizieren. Denn häufig tritt eine Besserung der Symptomatik bereits innerhalb weniger Tage unter niedrig-dosierter L-Dopa-Therapie ein, so daß noch nicht einmal ein Apomorphin-Test, der die therapeutische Wirksamkeit von L-Dopa voraussagen kann [45], nötig ist.

Der erste Schritt, eine DRD zu diagnostizieren, ist aber an sie zu denken. Die Dopa-responsive Dystonie sollte deshalb immer bei tageszeitlichen Schwankungen im Zusammenhang mit Bewegungsstörungen in die differentialdiagnostischen Überlegungen einbezogen werden.

6.10 Ausblick und Schlußfolgerung

Um die funktionelle Relevanz der in dieser Arbeit dargestellten Mutationen nachzuweisen, müßten sich Studien zur Aktivitätsmessung der GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) anschließen. Ferner stehen Sequenzierungen der cDNA bei den Splice site-Mutationen und der stummen Mutation aus.

Bei Patienten mit klinisch vorhandener Dopa-responsiver Dystonie (DRD) ohne Mutation im codierenden Bereich im Gen der GTPCH I (*GCHI*) müssen nicht-codierende Bereiche in 5'- und in 3'-Richtung sowie in den Introns untersucht werden. Vorher wäre es bei größeren Familien jedoch sinnvoll zu überprüfen, ob eine statistische Kopplung an Chromosom 14q gegeben ist.

Desweiteren sollten bei rezessivem Erbgang oder spontanem Auftreten Mutationen im Tyrosinhydroxylase-Gen und Parkin-Gen gesucht werden. Zusätzlich kommen die Gene, deren Produkte im Tetrahydrobiopterin (BH₄)-Stoffwechsel beteiligt sind, in Betracht. Hier sollte eine Stoffwechselanalyse im Liquor vorausgehen.

Eine genaue Untersuchung des BH₄-Stoffwechsels wäre auch sinnvoll für die Patienten mit Restsymptomatik, bei Mangel an Tryptophan könnte dann gezielt mit 5-Hydroxytryptophan oder mit BH₄ substituiert werden.

Die Bestimmung der GTPCH I-Aktivität und des Liquor-Neopterin bei den großen Familien mit nachgewiesener *GCHI*-Mutation könnte auch zur Lösung der Frage der Penetranz verhelfen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das bisherige Symptomenspektrum der DRD bestätigt und durch den Nachweis einer *GCHI*-Mutation bei oromandibulärer Dystonie um fokale Dystonien erweitert werden.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen nicht nur zum besseren Verständnis der Dopa-responsiven Dystonie bei, sondern zeigen auch deren enge Verknüpfung zu den Tetrahydrobiopterinopathien, dem juvenilen Parkinson und den anderen Erkrankungen aus dem dystonen Formenkreis.

7 Anhang

7.1 GTP-Cyclohydrolase 1-Gen

7.1.1 Exon 1 mit angrenzendem Intron und Promotor-Region (aus NCBI-Accession L29478)

CAAT_Signal: 2557..2563 (fett); TATA_Signal: 2601..2605 (fett); 5'UTR: 2656..2790 (kursiv); Exon 1: 2791..3133 (Großbuchstaben)

```
5' 1 ctgcagtgtt cagtctctga cttgggtgtgt ctttctcatc tgccctctttg ttctgctgct
61 gtcctagaaa ttagagactt taaaaaattc cttggctttt tggtagaaaag aaactcccag
121 actgggtcca agctgaaaat gaatccctta ctgggtgaaa aacatggatg cggtaacaat
181 tcctggctgt aaatgctcat aatattactg ttgaaccatt ttatgctaataa attatctctg
241 ggacctactt cccttttggg ttattcctct ttttttctcc tgttgctact tataaccatc
301 cttgtcaact atctacattt tactattaaa ttattcatat aatggtgggtg atttcaaagt
361 tttcttgat ttttttggg catttggccg aaaggcactg cctccatttt acaagttagc
421 atgtatccag aggcctgtc ctgcaacaaa ggtgcagggtg cctcagtggc aatacgtgta
481 agaaaatgtt aatttttagg gtaaaaattt cattagaaac tgtctttgtg gaatacaata
541 ttagttaatc tttacacatg tttttaaagg aagacgaaag attgccacta aaaataaatt
601 cgtactgaaa gcatctctat ctactctctc cattttttaa gtacctcact tagtatcttt
661 gttttcattt gttaaagtca aggtcatcct ttgaatgttg tcttcaacta tgcttgaaat
721 agcttgagac ccagcagata attctgacca ggaggtatca gcagacagtg ggcagcacag
781 ttagaggaaa aaaatgttgc agggcccccac tccaataaaa aacctacaat aaaaaattta
841 aaaattttta taaagaggaa aatgacaaag aggttttcca aaggatgttc atattctcta
901 tttaaaaacc ccactgggccc gggtagcgtg gctcaggcct ataactctga gccctggagt
961 tcgagaccag ctttggcaac atggtgaaac cttatctcta ccaaaaatac aaaaattagc
1021 cagtctcata acccgctctt aaataaatag attaaaattt aaaaataaat aaataaataa
1081 ataaataaat aaataacccc actgatatga acatttcttc cattttggag taaaggtgcc
1141 tacaaggcta ggcaatgtcc atatttcttt cctgaatgtt tccaacgggg ctgctgctag
1201 agcagatgta tcataaatac taattactta ttataatgac caagctacat tgtagcata
1261 gaataattcc acaggcttcc ctattgggtt gtttgatcct aagcctatta atacctgctt
1321 ctatgtcaga aaatctacat taggccaggc atggtggctc acacctgtaa tcccagcact
1381 ttgggaggcc gaggcagggt gatcacctga ggtcaggagt tcgagcacca gccctggccaa
1441 catggcaaca cccacctct cctaaaaata cccgggcatg gctggcagggtg
1501 cctgtaatcc cagctactca ggaggctgag gcaggagaat cgtttgaacc caggaggcgg
1561 aggatgaagt gagcctcaaa aaaaaaaaaa gaaaaaaaaa attattttga tacatgtttt
1621 aaagctcact tcggcattat gagataatcc tcagtgagga aaggtccatt tattaatctc
1681 aagaaaacag ttacagcaga tgtcactggt taagagttca gttggtgaat agcatttcac
1741 aatttgtagc aacatctggg gaaagacgct ttgcatggaa ctgtaaaaca attgagcacc
1801 aaatctgcac aactgcgttt ctagaaaatg cgatgggttt tatagagatg aggtcttgct
1861 atgttttcca ggctggtctc gaactcttgg cctcaagcga tcctcccgcg tcggtctccc
1921 caagcgccgg gagtacaggc gtgagccacc gacggaatg gattttaagt gaaagtccta
1981 tcttcgtttg caaatcaatt tttccaggat caaagttcta gcaaccataa atcctatcct
2041 tctagacata gggaccacaca taagggccac ttgatgtgac acttgccccg acagcgggtg
2101 cacctggccc ctaggtggca ggtgcgtttt taactaaacc caagagtctg aagtcacatt
2161 attctcttgc cttgaaaagt taagagttgg ttccctaact gtggcttaac tcggtctctc
2221 tccaggcaag gccacctgtt tgctgatctt tcacagggcg aggggaccgg agcccttcaa
2281 tgcagcggcc tcttggcctg aagagggggc gactgggcgc ccagaccgcg tctttctcac
2341 tgagatccca gtcctgggac gactgcctct tttcgggttc ggctcattcc gcaataagtg
2401 gaggggtccc gcctgatcct aggggcccgc gcccttttcc ttcctccctc gcgcttgcca
2461 acccctccgg gcgtctccgg agccgcgacc cctgctgggg acccgggggg cgggaggccg
2521 aggggcgcgg cgaggggcgt gacgcgaggc ggggcccggc aatgggagc ctcgcggcg
2581 caggctgagc cgccggggcca taaaaaaggag gcgcggccgg gctttccagc ctgtggccgc
2641 tcccggctcg gagtgtgatc taagcaggtc gcgtaccttc ctcagggtgac tccggccaca
2701 gcccattgtc cgcgggccacc ggcggagttt agccgcagac ctcgaagcgc cccgggggtcc
2761 ttcccgaacg gcagcgggctg cggcgggtcc ATGGAGAAGG GCCCTGTGCG GGCACCGGCG
2821 GAGAAGCCGC GGGGCGCCAG GTGCAGCAAT GGGTTCCCCG AGCGGGATCC GCCGCGGCC
2881 GGGCCAGCA GGCCGGCGGA GAAGCCCCCG CGGCCCGAGG CCAAGAGCGC GCAGCCCGCG
```

```

2941 GACGGCTGGA AGGGCGAGCG GCCCCGCAGC GAGGAGGATA ACGAGCTGAA CCTCCCTAAC
3001 CTGGCAGCCG CCTACTCGTC CATCCTGAGC TCGCTGGGCG AGAACCCCCA GCGGCAAGGG
3061 CTGCTCAAGA CGCCCTGGAG GGCGGCCTCG GCCATGCAGT TCTTCACCAA GGGCTACCA
3121 GAGACCATCT CAGgtcagtg cgcccgcggg ctgctagagc gtgcggggcgg cgggggcggt
3181 gcttgcagga aacgcgcgcc ggctccagga agtttccgga gttgcctcac ttttggcgca
3241 ggaagccggg cgctgtcacc tccgaacccg ccctagcctg ccgccctgcc gaggcctgcg
3301 tggggcacag tcgggggttc ctgggtggca gcgacctctc agccccggaa ctcgctgcag
3'

```

7.1.2 Exon 2 und angrenzende Intronbereiche (aus NCBI-Accession U19256)

Exon 2: 99..208 (Großbuchstaben); Teile von Intron 1 in 5'-Richtung, von Intron 2 in 3'-Richtung

```

5' 1 gtaacgctcg cttatgttga ctgtcatatt catgtttatc cataattcta cctttctata
61 aaattggaca tgttactaaa gcaagcctct gatttcagAT GTCCTAAACG ATGCTATATT
21 TGATGAAGAT CATGATGAGA TGGTGATTGT GAAGGACATA GACATGTTTT CCATGTGTGA
181 GCATCACTTG GTTCCATTTG TTGGAAGgt aaggttctct ttgttgtttc ccagcaattt
241 aaaacatagt gaaagttttt caattagaat aattatattt aaaattttta gctgccaatt
301 gctgatattc caggt 3'

```

7.1.3 Exon 3 und angrenzende Intronbereiche (aus NCBI-Accession U19257)

Exon 3: 136..191 (Großbuchstaben); Teile von Intron 2 in 5'-Richtung, von Intron 3 in 3'-Richtung

```

5' 1 agatgttttc aaggtaatac attgtcgtga taaattacat aaaagtgtac tatattcttt
61 ctatatttcc ttattttgtc acaaagaagg cactgtattt tcactcagct aatgatattc
121 gtctcttctc tgaagGTCCA TATTGGTTAT CTTCTTAACA AGCAAGTCCT TGGCCTCAGC
181 AACTTGCGA Ggtaagtgtg actgtccagt gaacaagaat acaggtttat aggacctgcc
241 ctcactctgtc gagaatcta 3'

```

7.1.4 Exon 4 und angrenzende Intronbereiche (aus NCBI-Accession U19258)

Exon 4: 83..114 (Großbuchstaben); Teile von Intron 3 in 5'-Richtung, von Intron 4 in 3'-Richtung

```

5' 1 gtcctttttg ttttatgagg aaggcttata aattttactt caaatgattt gtgattaact
61 aaaacaattc tttcttttct agGATTGTAG AAATCTATAG TAGAAGACTA CAAGgtaagc
121 tttaaaaatc tgtattaaca gaaaacattt ttcttttttt tcttttttta aattttttatt
181 tttgagacag agtcttgctc tgtcaccag gctggagtgc agtggtgcaa tctcggtcga
241 ctgcagcctc agccttccaa gtagctgaga ttataagagt gcatcacc

```

7.1.5 Exon 5 und angrenzende Intronbereiche (aus NCBI-Accession U19259)

Exon 5: 41..125 (Großbuchstaben); Teile von Intron 4 in 5'-Richtung, von Intron 5 in 3'-Richtung

```

5' 1 gtgtcagact ctcaaactga gtccttata acatccacag TTCAGGAGCG CCTTACAAAA
61 CAAATTGCTG TAGCAATCAC GGAAGCCTTG CGGCCTGCTG GAGTCGGGGT AGTGGTTGAA
121 GCAACgtaag tctgcatctg ccttttagtaa cgtcataatg gtgcactaga agtga

```


7.1.6 Exon 6 und angrenzendes Intron 5 sowie angrenzende 3'-Region
(aus NCBI-Accession D38602)

Exon 6: 11..134; Teile von Intron 5 in 5'-Richtung

```

5' 1 tattttttag ACACATGTGT ATGGTAATGC GAGGTGTACA GAAAATGAAC AGCAAACTG
61 TGACCAGCAC AATGTTGGGT GTGTTCCGGG AGGATCCAAA GACTCGGGAA GAGTTCCTGA
121 CTCTCATTAG GAGCtgagct tcattcagtg tgtgtgcggt ggttgccgat cgtactgcca
181 gtagcattgt ctgtctgtcc ggtcttgttt gtacattcca ttttcaattg ttacagatgt
241 gaactttatt ccttgtcact aattatatatt aaaattattt ctaggaagtc aaataaatat
301 aataaagggt tgagccctct actttcttct tgccaccttt ttgtggcaat attaaagtga
361 actgctaata gtgtaagtac gtgcacaaaa ccactgccag ataaccagag gggcctggga
421 agggagaaga attagtgtat ttttttcaaa tagtacagta atttgcctca taagcatagg
481 agcattggga atgagaggga actgtgcccc gtatactggt ttttttcttc ctccaataaa
541 agtgggtgtag tgccgaaaagt gctaaaatat ttagtgcggt attgctctgt gaattcaagt
601 tcaacagact tcacttttgt catgtttatt aaaccaccag tgacatttaa aaatatattt
661 ttagcagtcg taatgttagt caccaaggga aggtgggtgga atgtctatgt ttttgatttt
721 actgtgagtt aaaaaggcac atttctacct tctattgttt ttaaattcaa gaataggga
781 ttagttcctg gtgttgttta cgagtgtatt ctctgtgtcaa catacaggga tttagacatt
841 taactctctg tgcttgata agaatatcat ttagagtgtg gatacttttg cttttttaa
901 aaagccatta ttttatgaga cttagtactc aactgcaaaa taactagtca gctcagtttt
961 aactttatag gtttattgag tttcctttgt gtgatccatg tagatgcctc aaaatgtttc
1021 ttcttcttct tttttttaat cttataagat atttttctaa gtatttccag aaacatttga
1081 gagtgcccat cattttcagg tctgcagaac catagcttcc acgcacctga acgagcacag
1141 aatgaactga cggtggaaga cattatgagc tgtgtccaac gttttaacca aagcgtatcg
1201 taccaacgat ctgtgaaaat gcactggaag cttctgggtcc cggtttcctt tgtgggtctat
1261 gtgggtcttg tcctcattgt aactccgtat agatgggtata ggtattttta tcctggaagc
1321 tgttgcctta ttaatgatta tcttaaaatt tcctccattg gggcagcgtg ggccaaatta
1381 aaacaaacaa aaccgcaact cctccacaga aacacaaaca cagttattcc atgaagttta
1441 gtatttgggt gacatagtgc tcttcaaatt catcccatta ccctaaaagt aataactttg
1501 atgcttgctt taactttagt ccatctctg ccactttgat gctatttggg ttatgatggg
1561 gcaagatggc agaggtattg ggttttttg tttttttcca ttctctctta cttctgtttc
1621 ctagcttttt ctttctggag ttttaagtaca gtgatgggtg gcttgagtac ctttttaaat
1681 ctagcccagt ataaacatta gcctgcttaa tatttagaca tttataggta gaattctgag
1741 cactcaactc atgtttggca ttttaaagta aaaacaagtg tgacttcgag gaccaaagaa
1801 attgtcagct atacatttat ctttatgaac tcatttatat tcctttttta tgactcgttg
1861 ttctaacatt tcctagaagt gttcttataa aggtctaagt tatccacagg ctgttgtctt
1921 attagtaaat gcaaagtaat gactttgtct gttttactct agtctttagt acttcaaaat
1981 taccttttca tatccatgat cttgagtcca tttgggggat ttttaagaat ttgatgtatt
2041 tcaatacact gttcaaaatt aaattgttta attttatgta tgagtatgta tgttcctgaa
2101 gttggctcta tttaaattat taaactattg taactttgtt cttgtgaaag ttgtttcttt
2161 ttcaaccacc acta 3'

```

7.1.7 GCH1 translatierte Exone 1 - 6

Die Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code (Tabelle 7-1) stehen oberhalb den ersten Basen der Trinukleotide, die Exon-Grenzen unterhalb der Nukleotidsequenz. (Ausschnitt aus „Homo sapiens GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia) (GCH1), mRNA“, Quelle: NCBI-Accession NM_000161).

```

      5´                                     M   E   K   G   P   V   R   A   P   A   E
121 cccgaacggc agcgggtgcg gcggggtccAT GGAGAAGGGC CCTGTGCGGG CACCGGCGGA

      K   P   R   G   A   R   C   S   N   G   F   P   E   R   D   P   P   R   P   G
181 GAAGCCGCGG GGC GCCAGGT GCAGCAATGG GTTCCCCGAG CGGGATCCGC CGCGGCCCGG

      P   S   R   P   A   E   K   P   P   R   P   E   A   K   S   A   Q   P   A   D
241 GCCCAGCAGG CCGGCGGAGA AGCCCCCGCG GCCCGAGGCC AAGAGCGCGC AGCCCCGCGGA

      G   W   K   G   E   R   P   R   S   E   E   D   N   E   L   N   L   P   N   L
301 CGGCTGGAAG GGCGAGCGGC CCCGAGCGA GGAGGATAAC GAGCTGAACC TCCCTAACCT

      A   A   A   Y   S   S   I   L   S   S   L   G   E   N   P   Q   R   Q   G   L
361 GGCAGCCGCC TACTCGTCCA TCCTGAGCTC GCTGGGCGAG AACCCCAGC GGCAAGGGCT

      L   K   T   P   W   R   A   A   S   A   M   Q   F   F   T   K   G   Y   Q   E
421 GCTCAAGACG CCCTGGAGGG CGGCCTCGGC CATGCAGTTC TTCACCAAGG GCTACCAGGA

      T   I   S   D   V   L   N   D   A   I   F   D   E   D   H   D   E   M   V   I
481 GACCATCTCA GATGTCCTAA ACGATGCTAT ATTTGATGAA GATCATGATG AGATGGTGAT

      1←|→2
      V   K   D   I   D   M   F   S   M   C   E   H   H   L   V   P   F   V   G   K
541 TGTGAAGGAC ATAGACATGT TTTCCATGTG TGAGCATCAC TTGGTCCAT TTGTTGGA

      V   H   I   G   Y   L   P   N   K   Q   V   L   G   L   S   K   L   A   R   I
601 GGTCCATATT GGTATCTTC CTAACAAGCA AGTCCTTGGC CTCAGCAAAC TTGCGAGGAT

      2←|→3                                     3←|→4
      V   E   I   Y   S   R   R   L   Q   V   Q   E   R   L   T   K   Q   I   A   V
661 TGTAGAAATC TATAGTAGAA GACTACAAGT TCAGGAGCGC CTTACAAAAC AAATTGCTGT

      4←|→5
      A   I   T   E   A   L   R   P   A   G   V   G   V   V   V   E   A   T   H   M
721 AGCAATCACG GAAGCCTTGC GGCCTGCTGG AGTCGGGGTA GTGGTTGAAG CAACACACAT

      5←|→6
      C   M   V   M   R   G   V   Q   K   M   N   S   K   T   V   T   S   T   M   L
781 GTGTATGGTA ATGCGAGGTG TACAGAAAAT GAACAGCAAA ACTGTGACCA GCACAATGTT

      G   V   F   R   E   D   P   K   T   R   E   E   F   L   T   L   I   R   S   X
841 GGGTGTGTTC CGGGAGGATC CAAAGACTCG GGAAGAGTTC CTGACTCTCA TTAGGAGCTG

      3´
901 Agcttcattc agtgtgtgtg

```

7.2 Tabellen

Tabelle 7-1 Ein-Buchstaben-Code und Abkürzungen für Aminosäuren

A Alanin (Ala)	C Cystein (Cys)	D Asparaginsäure (Asp)	E Glutaminsäure (Glu)
F Phenylalanin (Phe)	G Glycin (Gly)	H Histidin (His)	I Isoleucin (Ile)
K Lysin (Lys)	L Leucin (Leu)	M Methionin (Met)	N Asparagin (Asn)
P Prolin (Pro)	Q Glutamin (Gln)	R Arginin (Arg)	S Serin (Ser)
T Threonin (Thr)	V Valin (Val)	W Tryptophan (Trp)	Y Tyrosin (Tyr)
X Stop-Codon			

Tabelle 7-2 Mutationen im GTP-Cyclohydrolase 1-Gen (Stand: Juni 2001). Zum Auffinden der Nukleotid position in 7.1.7 148 bp addieren.

Genlocus	Basen- veränderung	Protein- veränderung	Mutation	Quelle
<i>Autosomal-dominante Dopa-responsive Dystonie (AD-DRD), heterozygot</i>				
5'-UTR	c(-132)t	Transkriptions-/		[4]
5'-UTR	c(-39)t	Translations-		[4]
5'-UTR	c(-22)t	Defekt (?)		*
Exon 1	G3C	Met1Ter	Nonsense	[118]
Exon 1	3insG	Glu2Ter	Frameshift	[48]
Exon 1	C68T	Pro23Leu	Missense	diese Arbeit [20, 55]
Exon 1	149delC	Pro49Ter	Frameshift	[35]
Exon 1	G165T	Glu56Ter	Nonsense	[4]
Exon 1	G181T	Glu61Ter	Nonsense	[80]
Exon 1	G193T	Glu65Ter	Nonsense	[36]
Exon 1	212delT	Asn70Ter	Frameshift	[35]
Exon 1	T212A	Leu71Glu	Missense	[4]
Exon 1	C221T	Ala74Val	Missense	[4]
Exon 1	C225A	Tyr75Stop	Missense	diese Arbeit
Exon 1	229del18bp	delSer77-Leu82	Missense	[35]
Exon 1	T236C	Leu79Pro	Missense	[49]
Exon 1	G248C	Gly83Ala	Missense	[4]
Exon 1	C262T	Arg88Trp	Missense	[48]
Exon 1	G263C	Arg88Pro	Missense	[3]
Exon 1	229del6bp	delArg88-Gln89	Missense	*
Exon 1	C281A	Thr94Lys	Missense	[65a]
Exon 1	G288A	Trp96Ter	Nonsense	[102]
Exon 1	T305A	Met102Lys	Tansversion	[51]
Exon 1	T305G	Met102Arg	Missense	[79]
Exon 1	309delG	Met102Ter	Frameshift	[13]
Exon 1	?	Gly108Asp	Missense	*
Exon 1	G323T	Gly108Val	Missense	*
Exon 1	C328T	Gln110Ter	Nonsense	[120]
Exon 1	329insA	Tyr109Ter	Frameshift	[35]
Exon 1	C341A	Ser114Ter	Nonsense	[35, 36, 42]
Exon 1	C341G	Ser114Ter	Nonsense	[Nomura] [#]
Exon 1	A342T	Ser114/Exonverlust?	Stumme M./Frameshift	[4]
Exon 1	G343A	Asp115Asn	Missense	[55]
Intron 1	g(-1)a	delExon 2/Ser114Ter	Splice site	[35, 36]
Intron 1	a(-2)g	delExon 2/Ser114Ter	Splice site	[113]
Exon 2	351delA	Val116Ter	Frameshift	[35]
Exon 2	A401T	Asp134Val	Missense	[48]
Exon 2	T404A	Ile135Lys	Missense	[16]
Exon 2	T421C	Cys141Arg	Missense	[79]
Exon 2	T423G	Cys141Trp	Missense	[51]
Exon 2	A431C	His144Pro	Missense	[118]
Intron 2	g(+1)c	delExon 2/Ser114Ter	Splice site	[42, 118]
Intron 2	a(-2)g→454insG	Lys151Ter	Splice site/Framesh.	[113]
Exon 3	A458C	His153Pro	Missense	[3]
Exon 3	477delC		Frameshift	[110]
Exon 3	T488G	Leu163Arg	Missense	[110]
Intron 3	g(+1)t	?	Splice site	[110]

Tabelle 7-2 Fortsetzung

Genlocus	Basen- veränderung	Protein- veränderung	Mutation	Quelle
Intron 3	g(-1)a	delExon 4/Ala169Ter	Splice site	[35]
Exon 4	511del13bp	Ile171Ter	Frameshift	[49]
Exon 4	G527C	Ser176Thr	Missense	[51]
Exon 4	A534T	Arg178Ser	Missense	[7]
Exon 4	C538T	Gln180Ter	Nonsense	[79]
Exon 4	A539G	Gln180Arg	Missense	*
Intron 4	g(+1)c	?	Splice site	diese Arbeit
Intron 4	a(-2)c	?	Splice site	diese Arbeit
Exon 5	C544T	Gln182Ter	Nonsense	[113]
Exon 5	G551A	Arg184His	Missense	[Segawa] [#]
Exon 5	T554G	Leu185Arg	Missense	*
Exon 5	C557A	Thr186Lys	Missense	[52]
Exon 5	567delG	Val191Ter	Frameshift	[Furukawa] [#]
Exon 5	G571A	Val191Ile	Missense	[4]
Exon 5	G582A		stumme	diese Arbeit
Exon 5	G586T	Ser196Ala	Missense	diese Arbeit
Exon 5	C596T	Pro199Leu	Missense	*
Exon 5	G602A	Gly201Glu	Missense	*
Exon 5	G607A	Gly203Arg	Missense	diese Arbeit [3, 4]
Intron 5	g(+1)a	delExon 5/Gln180Ter	Splice site	[4, 44]
Intron 5	(+3)ins t	?	Splice site	diese Arbeit
Intron 5	g(+5)a	?		[110]
Exon 6	631delAT	His210Ter	Frameshift	[4, 35]
Exon 6	A631G	Met211Val	Missense	[110]
Exon 6	G633A	Met211Ile	Missense	*
Exon 6	C646T	Arg216Ter	Nonsense	[3]
Exon 6	T662C	Met221Thr	Missense	[8]
Exon 6	A670T	Lys224Ter	Nonsense	[4, 55]
Exon 6	A671G	Lys224Arg	Missense	[3]
Exon 6	T701C	Phe234Ser	Missense	[3]
Exon 6	C721T	Arg214Trp	Missense	[4]
<i>Dopa-responsive Dystonie (compound heterozygot)</i>				
Exon1/Exon6	C68T/A670T	Pro23Leu/Lys224Ter	Missense/Nonsense	[55]
Exon 1/Exon 6	G321A/A671G	Gly108Asp/Lys224Arg	Missense/Missense	[30]
Intron 1/Exon 5	a(-2)g/G571A	delExon2/Val191Ile	Frameshift/Missense	[4]
Exon 2/Exon 6	351delA/T662C	Val116Ter/Met221Thr	Frameshift/Missense	[30]
<i>Dopa-responsive Dystonie (homozygot)</i>				
Exon 6	C747G	Arg259Ser	Missense	*
<i>GCH1-Mangel, atypische Hyperphenylalaninämie (homozygot)</i>				
Exon 1	C328T	Gln110Ter	Nonsense	[Ichinose] [#]
Exon 5	G551A	Arg184His	Missense	[49]
Exon 6	A631G	Met211Val	Missense	[4]
Exon 6	G633A	Met211Ile	Missense	[10, 49]

erstellt mit Hilfe von [50][#] und www.bh4.org/biomdb1.html * (von N. Blau, B. Thöny und I. Dianzani)

7.3 Abkürzungen

A	Adenin
Ac	Acetat
AD	autosomal-dominant
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AR	autosomal-rezessiv
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	Calf Intestate Phosphatase
Cl	Chlor
CTP	Cytosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DHPR	Dihydrobiopterinreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRD	Dopa-responsive Dystonie
dYT	dry Yeast Trypton
<i>DYT1</i>	Genlokus der Dystonie 1, TorsinA-Gen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FD	Fluorodopa
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
G	Guanin
<i>GCHI</i>	GTP-Cyclohydrolase I-Gen
GTP	Guanosintriphosphat
GTPCH I	GTP-Cyclohydrolase I
HBSS	Hanks' gepufferte Salzlösung
H ₂ O dd	bidestilliertes Wasser
HPA	Hyperphenylalaninämie
IP	idiopathischer Parkinsonismus
ITD	idiopathische Torsionsdystonie
JP	juveniler Parkinson
kb	Kilobasenpaare
6-LPH ₄	6-Lactoyltetrahydropterin
M	molare Lösung

M.	Morbus
Mg	Magnesium
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
Na	Natrium
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NH ₂ TP	Dihydroneopterintriphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
³² P	radioaktives Phosphoristotop
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PHA	Phenylalaninhydroxylase
PKU	Phenylketonurie
6PPH ₄	6-Pyruvoyltetrahydropterin
qBH ₂	chinoides 7,8-Dihydrobiopterin
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SPECT	Single-Photon Emissionstomographie
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
STR(P)	Short Tandem Repeat (Polymorphism)
T	Thymin
TBE	Trizma Base/Borsäure/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFB	Transformationspuffer
TH	Tyrosinhydroxylase
TPH	Tryptophanhydroxylase
TTP	Thymidintriphosphat
5'-UTR	5'-untranslated region
verd.	verdünnt
XR	X-chromosomal rezessiv
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Zusammenfassung

Die Dopa-responsive Dystonie (DRD) oder auch hereditäre progressive Dystonie mit ausgeprägten tageszeitlichen Schwankungen (Segawa-Syndrom) wird vorwiegend autosomal-dominant mit unvollständiger Penetranz vererbt. Sie beginnt meist im Kindesalter mit einer progredienten Gangstörung, die häufig als spastische Paraparese fehlgedeutet wird und nicht selten zu operativen Korrekturen führt. Eine Therapie mit L-Dopa in niedriger Dosis (1-3 mg/kg KG) führt zu einer raschen und langanhaltenden Besserung der Symptome bis hin zur völligen Beschwerdefreiheit.

Als Gendefekte wurden bisher das GTP-Cyclohydrolase I-Gen (*GCHI*) auf Chromosom 14q22.1-22.2 für die dominante und das Tyrosinhydroxylase-Gen (*TH*) auf Chromosom 11p15.5 für die rezessive Form der DRD identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 24 Familien, davon 15 mit klinisch gesicherter DRD, sieben mit möglicher und zwei mit eher unwahrscheinlicher DRD molekulargenetisch untersucht. Bei neun Familien konnten sechs neue sowie zwei bereits veröffentlichte Mutationen in *GCHI* nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um sieben Punktmutationen, von denen zwei an Spleißstellen lokalisiert sind [g(+1)c und a(-2)c in Intron 4], und eine Insertion im Bereich einer Spleißstelle [(+3)ins t im Intron 5]. Die Transversion von C→A an der Position 225 in Exon 1 führt zu einem Kettenabbruch bei der Translation. Die beiden Transversionen C68T in Exon 1 und G607A in Exon 5 waren vorher bekannt.

Bei einem Patienten mit fokaler, oromandibulärer Dystonie mit Beginn im Erwachsenenalter konnten zwei neue Basenaustausche in Exon 5 auf einem Chromosom nachgewiesen werden. Diese sind eine stumme Mutation (G582A) und eine Punktmutation von G→T an Position 586, wodurch Alanin im Protein an Position 196 durch Serin ersetzt wird. Über den Vererbungsmodus ist bei diesem Patienten nichts bekannt.

Für die Familien ohne Nachweis einer Mutation im codierenden Bereich von *GCHI* werden weitere Möglichkeiten der Mutationsanalyse im nicht-translatierten Bereich von *GCHI* sowie in den Kandidatengenen, deren Produkte am Tetrahydrobiopterinstoffwechsel beteiligt sind, im *TH*-Gen und im Parkin-Gen aufgezeigt. Bei keiner der Familien konnte jedoch die bekannte 3 bp-Deletion im TorsinA-Gen (*DYT1*) auf Chromosom 9q34, die die idiopathische Torsionsdystonie verursacht, nachgewiesen werden.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Ad Hoc Committee of the Dystonia Medical Research Foundation (1984) Mitglieder: Barbeau A, Calne DB, Fahn S, Marsden CD, Menkes J, Wooten GF
- [2] Augood SJ, Martin DM, Ozelius LJ, Breakefield XO, Penney JB, Standaert DG (1999) Distribution of the mRNAs Encoding TorsinA and TorsinB in the Normal Adult Human Brain. *Ann Neurol* **46**: 761-769
- [3] Bandmann O, Nygaard TG, Surtees R, Marsden CD, Wood NW, Harding AE (1996) Dopa-responsive dystonia in British patients: new mutations of the GTP-cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* **5**: 403-406
- [4] Bandmann O, Valente EM, Holmans P, Surtees RAH, Walters JH, Wevers RA, Marsden CD, Wood NW (1998) Dopa-Responsive Dystonia: A Clinical and Molecular Genetic Study. *Ann Neurol* **44**: 649-656
- [5] Berlit P: Basiswissen Neurologie 3., korrigierte und aktualisierte Aufl. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1998) 358, 370-373
- [6] Bhatia KP, Marsden CD (1994) The behavioural and motor consequences of focal lesions of the basal ganglia in man. *Brain* **117**: 859-876
- [7] Beyer K, Lao-Villadoniga JI, Vecino-Bilbao B, Cacabelos R, de la Fuente-Fernandez R (1997) A novel point mutation in the GTP cyclohydrolase I gene in a Spanish family with hereditary progressive and dopa responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **62** (4): 420-421
- [8] Bezin L, Nygaard TG, Neville JD, Shen H, Levine RA (1998) Reduced lymphoblast neopterin detects GTP cyclohydrolase dysfunction in dopa-responsive dystonia. *Neurology* **50**: 1021-1027
- [9] Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* **7**: 1513-1522
- [10] Blau N, Ichinose H, Nagatsu T, Heizmann CW, Zacchello F, Burlina AB (1995) A missense mutation in a patient with guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency missed in the newborn screening program. *J Pediatr* **126**: 401-405
- [11] Bonafé L, Thöny B, Leimbacher W, Kierat L, Blau N (2001) Diagnosis of Dopa-responsive Dystonia and Other Tetrahydrobiopterin Disorders by the Study of Biopterin Metabolism in Fibroblasts. *Clin Chem* **47**(3): 477-485
- [12] Boyd K, Patterson V (1989) Dopa responsive dystonia: a treatable condition misdiagnosed as cerebral palsy. *Br Med J* **298**: 1019-1020
- [13] Bräutigam C, Steenbergen-Spanjers GCH, Hoffmann GF, Dionisi-Vici C, van den Heuvel LPWJ, Smeitink JAM, Wevers RA (1999) Biochemical and Molecular Genetic Characteristics of the Severe Form of Tyrosine Hydroxylase Deficiency. *Clin Chem* **45**(12): 2073-2087
- [14] Bräutigam C, Wevers RA, Jansen RJT, Smeitink JAM, de Rijk-van Andel JF, Gabreels FJM, Hoffmann GF (1998) Biochemical hallmarks of tyrosine hydroxylase deficiency. *Clin Chem* **44**(9): 1897-1904

- [15] Bressman SB, de Leon D, Brin MF, Risch N, Shale H, Burke RE, Greene PE, Fahn S (1988) Inheritance of idiopathic torsion dystonia among Ashkenazi Jews. *Adv Neurol* **50**: 45-56
- [16] Brique S, Destee A, Lambert JC, Mouroux V, Delacourte A, Amouyel P, Chartier-Harlin MC (1999) A new GTP-cyclohydrolase I mutation in an unusual dopa-responsive dystonia, familial form. *Neuroreport* **10**(3): 487-491
- [17] Calne DB (1994) Dopa-responsive Dystonia. *Ann Neurol* **35**: 381-382
- [18] Charles PD, Davis TL, Robertson D, Fenichel GM (1995) Dystonia and Unique Muscle Features. *Arch Neurol* **52**: 825-826
- [18a] Chung-on Leung J, Klein C, Friedman J, Vieregge P, Jacobs H, Doheny D, Kamm C, de Leon D, Pramstaller PP, Penney JB, Eisengart M, Jankovic J, Gasser T, Bressman SB, Corey DP, Kramer P, Brin MF, Ozelius L, Breakefield XO (2001) Novel mutation in the *TOR1A* (*DYT1*) gene in atypical, early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *Neurogenetics* **3**: 133-143
- [19] Citron BA, Kaufman S, Milstien S, Naylor EW, Greene CL, Davis MD (1993) Mutation on the 4 α -carbinolamine dehydratase gene leads to mild hyperphenylalaninemia with defective cofactor metabolism. *Am J Hum Genet* **53**: 768-774
- [20] de la Fuente-Fernández R (1998) Tardive dyskinesia in dopa-responsive dystonia: A reappraisal of the dopamine hypothesis of tardive dyskinesia. *Neurology* **50**: 1134-1135
- [21] Dionisi-Vici C, Hoffmann GF, Leuzzi V, Hoffken H, Bräutigam C, Rizzo C, Steenbergen-Spanjers GCH, Smeitink JAM, Wevers RA (2000) Tyrosine hydroxylase deficiency with severe clinical course: Clinical and biochemical investigations and optimization of therapy. *J Pediatr* **136**: 560-562
- [22] Dooling EC, Adams RD (1975) The pathological anatomy of post-hemiplegic athetosis. *Brain* **98**: 29-48
- [23] Endo K, Tanaka H, Saito M, Tsuji S, Nygaard TG, Weeks DE, Nomura Y, Segawa M: The gene for hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (HPD) maps to chromosome 14q. In: Segawa M & Nomura Y (Hrsg.) Age-related monoamine-dependent disorders and their modulation by gene and gender; Karger Basel (1995) 120-125
- [24] Fahn S, Marsden CD, Calne DB: Classification and investigation of dystonia. In: Marsden CD, Fahn S (eds) Movement disorders 2. Butterworths, London (1987) 332-358
- [25] Fahn S (1986) Generalized Dystonia: Concept and Treatment. *Clin Neuropharmacol* **9**(Suppl 2): 37-48
- [26] Fink JK, Barton N, Cohen W, Lovenberg W, Burns RS, Hallett M (1988) Dystonia with marked diurnal variation associated with bipterin deficiency. *Neurology* **38**: 707-711
- [27] Fink JK; Filling-Katz MR, Barton NW, Macrae PR, Hallett M, Cohen WE (1998) Treatable dystonia presenting as spastic cerebral palsy. *Pediatrics* **82**: 136-138
- [28] Flatmark T, Knappskog PM, Fjorgo E, Martinez A (1997) Molecular characterization of disease related mutant of human phenylalanine hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *Pteridines* **8**: 58-59

- [29] Fletcher NA, Holt IJ, Harding AE, Nygaard TG, Mallet J, Marsden CD (1989) Tyrosine hydroxylase and levodopa responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **52**: 112-114
- [30] Furukawa Y, Graf WD, Wong H, Shimadzu M, Kish SJ (2001) Dopa-responsive dystonia simulating spastic paraplegia due to tyrosine hydroxylase (TH) gene mutations. *Neurology* **56**: 260-263
- [31] Furukawa Y, Guttman M, Sparagana SP, Trugman JM, Hyland K, Wyatt P, Lang AE, Rouleau GA, Shimadzu M, Kish SJ (2000) Dopa-responsive Dystonia due to a Large Deletion in the GTP Cyclohydrolase I Gene. *Ann Neurol* **47**: 517-520
- [32] Furukawa Y, Kish SJ (1998) Influence of development and aging on brain biop-
terin: Implications for dopa-responsive dystonia onset. *Neurology* **51**: 632-634
- [33] Furukawa Y, Kish SJ (1999) Dopa-Responsive Dystonia: Recent Advances and
Remaining Issues To Be Addressed. *Mov Disord* **14(5)**: 709-715
- [34] Furukawa Y, Kish SJ, Bebin M, Jacobson RD, Fryburg JS, Wilson WG, Shi-
madzu M, Hyland K, Trugman JM (1998) Dystonia with Motor Delay in Com-
pound Heterozygotes for GTP-Cyclohydrolase I Gene Mutations. *Ann Neurol*
44: 10-16
- [35] Furukawa Y, Lang AE, Trugman JM, Bird TD, Hunter A, Sadeh M, Tagawa T,
St George-Hyslop PH, Guttman M, Morris LW, Hornykiewicz O, Shimadzu M,
Kish SJ (1998) Gender-related penetrance and de novo GTP-cyclohydrolase I
gene mutations in dopa-responsive dystonia. *Neurology* **50**: 1015-1020
- [36] Furukawa Y, Shimadzu M, Rajput AH, FRCPC, Shimizu Y, Tagawa T, Mori H,
Yokochi M, Narabayashi H, Hornykiewicz O, Mizuno Y, Kish SJ (1996) GTP-
Cyclohydrolase I Gene Mutations in Hereditary Progressive and Dopa-respon-
sive Dystonia. *Ann Neurol* **39**: 609-617
- [37] Görke W, Bartholomé K (1990) Biochemical and neurophysiological investi-
gations in two forms of Segawa's disease. *Neuropediatrics* **21(1)**: 3-8
- [38] Gordon N (1996) Dopa-responsive Dystonia: A Widening Spectrum. *Dev Med
Child Neurol* **38**: 554-559
- [39] Harwood G, Hierons R, Fletcher NA, Marsden CD (1994) Lessons from a re-
markable family with dopa-responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*
57: 460-463
- [40] Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* **2(5)**:
338-346
- [41] Hesslinger C, Kremmer B, Hültner L, Ueffing M, Zieger I (1998) Phos-
phorylation of GTP cyclohydrolase I and modulation of its activity in rodent
mast cells: GTP cyclohydrolase I hyperphosphorylation is coupled to high affi-
nity IgE receptor signaling and involves protein kinase C. *J Biol Chem* **273**:
21616-21662
- [42] Hirano M, Tamaru Y, Nagai Y, Ito H, Imai T, Ueno S (1995) Exon Skipping
cause by a base substitution at a splice site in the GTP cyclohydrolase I gene in
a Japanese family with Hereditary progressive dystonia/Dopa-responsive dysto-
nia. *Biochem Biophys Res Com* **213(2)**: 645-651
- [43] Hirano M, Ueno S (1999) Mutant GTP cyclohydrolase I in autosomal dominant
dystonia and recessive hyperphenylalaninemia. *Neurology* **52**: 182-184

- [44] Hirano M, Ynagihara T, Ueno S (1998) Dominant Negative Effect of GTP Cyclohydrolase I Mutations in Dopa-Responsive Hereditary Progressive Dystonia. *Ann Neurol* **44**: 365-371
- [45] Hughes AJ, Lees AJ, Stern GM (1990) Apomorphine test to predict dopaminergic responsiveness in parkinsonian syndromes. *Lancet* **336(8713)**: 518
- [46] Hwu WL, Wang PJ, Hsiao KJ, Wang TR, Chiou YW, Lee YM (1999) Dopa-responsive dystonia induced by a recessive GTP cyclohydrolase I mutation. *Hum Genet* **105**: 226-230
- [47] Hyland K, Fryburg JS, Wilson WG, Bebin EM, Arnold LA, Gunasekera RS, Jacobson RD, Rost-Ruffner E, Trugman JM (1997) Oral phenylalanine loading in dopa-responsive dystonia: A possible diagnostic test. *Neurology* **48**: 1290-1297
- [48] Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H, Tsuji S, Fujita K, Nagatsu T (1994) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nature Genetics* **8**: 236-242
- [49] Ichinose H, Ohye T, Matsuda Y, Hori T, Blau N, Burlina A, Rouse B, Matalon R, Fujita K, Nagatsu T (1995) Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes. Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. *J Biol Chem* **270**: 10062-10071.
- [50] Ichinose H, Suzuki T, Inagaki H, Ohye T, Nagatsu T (1999) Molecular Genetics of Dopa-Responsive Dystonia. *Biol Chem* **380**: 1355-1364
- [51] Illarioshkin SW, Markova ED, Slominsky PA, Mjklina NI, Popava SN, Limborska SA, Tsuji S, Ivanova-Smolens IA (1998) The GTP cyclohydrolase I gene in Russian families with dopa-responsive dystonia. *Arch Neurol* **53**: 789-792
- [52] Imaiso Y, Taniwaki T, Yamada T, Yoshimura T, Hirano M, Ueno S, Kaneda N, Kira J (1998) A novel mutation of the GTP-cyclohydrolase I gene in a patient with hereditary progressive dystonia/dopa-responsive dystonia. *Neurology* **50(2)**: 517-519
- [53] Inagaki H, Ohye T, Suzuki T, Segawa M, Nomura Y, Nagatsu T, Ichinose H (1999) Decrease in GTP Cyclohydrolase I Gene Expression Caused by Inactivation of One Allele in Hereditary Progressive Dystonia with Marked Diurnal Fluctuation. *Biochem Biophys Res Com* **260**: 747-751
- [54] Janssen RJ, Wevers RA, Häussler M, Luyten JA, Steenbergen-Spanjers GCH, Hoffmann GF, Nagatsu T, van den Heuvel LPWJ (2000) A branch site mutation leading to aberrant splicing of the human tyrosine hydroxylase gene in a child with a severe extrapyramidal movement disorder. *Ann Hum Genet* **64**: 375-382
- [55] Jarman PR, Bandmann O, Marsden CD, Wood NW (1997) GTP cyclohydrolase I mutations in patients with dystonia responsive to anticholinergic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**: 303-308
- [56] Kaiser R, Ziegler G (1992) Hereditary progressive dystonia with diurnal fluctuation (Segawa's syndrome) – an unusual case. *Neuropediatrics* **23**: 268-271
- [57] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause

- autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**: 605-608
- [58] Knappskog PM, Flatmark T, Mallet J, Lüdecke B, Bartholomé K (1995) Recessively inherited L-dopa-responsive dystonia caused by a point mutation (Q381K) in the tyrosine hydroxylase gene. *Hum Mol Genet* **4**: 1209-1212
 - [59] Korinthenberg R, Palm D, Ullrich K, Kurlermann G (1986) Möglichkeiten und Grenzen der Behandlung mit Neurotransmittern bei neuropädiatrischen Erkrankungen. In: Aktuelle Neuropädiatrie, Fichsel H (Hrsg.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1987: 412-419
 - [60] Kostrzewa M, Grady DL, Moyzis RK, Flöter L, Müller U (1996) Integration of four genes, a pseudogene, thirty-one STSs, and a highly polymorphic STRP into the 7-10 Mb YAC contig of 5q34-q35. *Hum Genet* **97**: 399-403
 - [61] Kramer PL, Heiman GA, Gasser T, Ozelius LJ, de Leon D, Brin MF, Burke RE, Hewett J, Hunt AL, Moskowitz C, Nygaard TG, Wilhelmsen KC, Fahn S, Breakefield XO, Risch NJ, Bressman SB (1994) The *DYT1* gene on 9q34 is responsible for most cases of early limb-onset idiopathic torsion dystonia in non-Jews. *Am J Hum Genet* **55**: 468-475
 - [62] Leube B, Hendgen T, Kessler KR, Knapp M, Benecke R, Auburger G (1997) Evidence for DYT7 Being a Common Cause of Cervical Dystonia (Torticollis) in Central Europe. *Am J Med Gen* **74**: 529-532
 - [63] Leube B, Rudnicki D, Ratzlaff T, Kessler KR, Benecke R, Auburger G (1996) Idiopathic torsion dystonia: assignment of the gene to chromosome 18p in a German family with adult onset, autosomal dominant inheritance and purely focal distribution. *Hum Mol Gen* **5(10)**: 1673-1677
 - [64] Lüdecke B, Dworniczak B, Bartholomé K (1995) A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. *Hum Genet* **95**: 123-125
 - [65] Lüdecke B, Knappskog PM, Clayton PT, Surtees RAH, Clelland JD, Heales SJR, Brnad MP, Bartholomé K, Flatmark T (1996) Recessively inherited L-DOPA-responsive parkinsonism in infancy caused by a point mutation (L205P) in the tyrosine hydroxylase gene. *Hum Mol Gen* **5(7)**: 1023-1028
 - [65a] Markova ED, Slominsky PA, Illarioshkin SN, Miklina NI, Popova SN, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA (1999) A novel mutation in the GTP cyclohydrolase I gene associated with a broad range of clinical presentations in a family with autosomal dominant dopa-responsive dystonia. *Eur J Neurol* **6(5)**: 605-608
 - [66] Martin, Robin: Gel Electrophoresis: Nucleic Acids. BIOS Scientific Publishers Limited, (1996) 13-14,
 - [67] Marsden CD (1988) Investigations of dystonia. *Adv Neurol* **50**: 35-44
 - [68] Marsden CD, Harrison MJ, Bunday S (1976) Natural history of idiopathic torsion dystonia. *Adv Neurol* **14**: 177-187
 - [69] Micheli F, Pardal MF, Gatto E, Paradiso G (1991) Dopa-responsive dystonia masquerading as idiopathic kyphoscoliosis. *Clin Neuropharmacol* **14**: 367-371
 - [70] Müller U, Steinberger D, Németh AH (1998) Clinical and molecular genetics of

- primary dystonias, *Neurogenetics* **1**: 165-177
- [71] Nagatsu T, Ichinose H (1995) GTP cyclohydrolase I Gene, Tetrahydrobiopterin, and Tyrosine Hydroxylase Gene: Their Relations to Dystonia and Parkinsonism. *Neurochem Res* **21(2)**: 245-250
 - [72] Nagatsu T, Ichinose H (1999) Regulation of Pteridine-Requiring Enzymes by the Cofactor Tetrahydrobiopterin. *Mol Neurobiol* **19**: 79-96
 - [73] Naumann M, Pirker W, Reiner K, Lange K, Becker G, Brücke T (1997) [¹²³I]β-CIT single-Photon Emission Tomography in DOPA-Responsive Dystonia. *Mov Disord* **12(3)**: 448-451
 - [74] Naylor EW, Ennis D, Davidson GF, Wong LTK, Applegarth DA, Niederwieser A (1987) Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase I Deficiency: Early Diagnosis by Routine Urine Pteridine Screening. *Pediatrics* **79(3)**: 374-378
 - [75] Newton, Clive R.: PCR. Aus dem Englischen übersetzt von Kurt Beginnen. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl., (1994) 22, 40-45, 64, 154-157
 - [76] Nichol CA, Smith GK, Duch DS (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Ann Rev Biochem* **54**: 729-764
 - [77] Nicholas C. Dracopoli et al.: Current Protocols in Human Genetics (Vol.2) / editorial Board, John Wiley & Sons, Inc 1994
 - [78] Niederwieser A, Blau N, Wang M, Joller P, Atarés M, Cardesa-Garcia J (1984) GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine, and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. *Eur J Pediatr* **141**: 208-214
 - [79] Nishiyama N, Yukishita S, Hagiwara H, Kakimoto S, Nomura Y, Segawa M (2000) Gene mutation in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (HPD), strictly defined dopa-responsive dystonia. *Brain Dev* **22 (Suppl 1)**: 102-106
 - [80] Nitschke M, Steinberger D, Heberlein I, Otto V, Müller U, Vieregge P (1998) Dopa responsive dystonia with Turner's syndrome: clinical, genetic, and neuropsychological studies in a family with a new mutation in the GTP-cyclohydrolase I gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **64**: 806-808
 - [81] Nygaard TG (1993) Dopa-Responsive Dystonia – Delineation of the Clinical Syndrome and Clues to Pathogenesis. *Adv Neurol* **60**: 577-585
 - [82] Nygaard TG, Marsden CD, Duvoisin RC (1988) Dopa-responsive dysonia. *Adv Neurol* **50**: 377-384
 - [83] Nygaard TG, Marsden CD, Fahn S (1991) Dopa-responsive dystonia: Long-term treatment response and prognosis. *Neurology* **41**: 174-181
 - [84] Nygaard TG, Snow BJ, Fahn S, Calne DB. Dopa-responsive dystonia: Clinical characteristics and definition. In: Segawa M (Hrsg.) Hereditary Progressive Dystonia with Marked Diurnal Fluctuation. Parthenon, Carnforth, UK (1993) 21-35
 - [85] Nygaard TG, Takahashi H, Heiman GA, Snow BJ, Fahn S, Calne DB (1992) Long-Term Treatment Response and Fluorodopa Positron Emission Tomographic Scanning of Parkinsonism in a Family with Dopa-responsive Dystonia. *Ann Neurol* **32**: 603-608
 - [86] Nygaard TG, Trugman JM, de Yebenes JG, Fahn S (1990) Dopa-responsive

- dystonia: The spectrum of clinical manifestations in a large North American family. *Neurology* **40**: 66-69
- [87] Nygaard TG, Waran SP, Levine RA, Naini AB, Chutorian AM (1994) Dopa-Responsive Dystonia Simulating Cerebral Palsy. *Pediatr Neurol* **11**: 236-240
 - [88] Nygaard TG, Wilhelmsen KC, Risch NJ, Braun DL, Trugman JM, Gilliam TC, Fahn S, Weeks DE (1993) Linkage mapping of dopa-responsive dystonia (DRD) to chromosome 14q. *Nat Genet* **5**: 386-391
 - [89] Nygaard TG, Wooten GF (1998) Dopa-responsive dystonia: some pieces of the puzzle are still missing. *Neurology* **50**: 853-855
 - [90] Olsson JE, Brunk U, Lindvall B, Eeg-Olofsson O (1992) Dopa-responsive dystonia with depigmentation of the substantia nigra and formation of Lewy bodies. *J Neurol Sci* **112**: 90-95 (Abstract)
 - [91] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1988) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2766-2770
 - [92] Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, de Leon D, Brin MF, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Risch NJ, Buckler AJ, Gusella JF, Breakefield XO (1997) The early-onset torsion dystonia gene (*DYT1*) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* **17**: 40-48
 - [93] Patel K, Roskrow T, Davis JS, Heckmatt JZ (1995) Dopa responsive dystonia. *Arch Dis Child* **73**: 256-257
 - [94] Poeck K: Neurologie. 9., aktualisierte Aufl.. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1996) 105-106, 350-353
 - [95] Rajput AH, Gibb WRG, Zhong XH, Shannak KS, Kish S, Chang LG, Hornykiewicz O (1994) Dopa-responsive dystonia: pathological and biochemical observations in a case. *Ann Neurol* **35**: 396-402
 - [96] Rezvani I: Defects in Metabolism of Amino Acids. In: Behrman RE, Klienman RM, Jenson HB (Hrsg.): Nelson textbook of pediatrics. 16. Aufl. Saunders; Philadelphia (2000) 344-347
 - [97] Richard I, Beckmann JS (1995) How neutral are synonymous codon mutations? *Nat Genet* **10**: 259
 - [98] Risch N, de Leon D, Ozelius L, Kramer P, Almasy L, Singer B, Fahn S, Breakefield, X, Bressman S (1995) Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet* **9**: 152-159
 - [99] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239(4839)**: 487-491
 - [100] Sakar G, Yoon HS, Sommer SS (1992) Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res* **20**: 871-878
 - [101] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
 - [102] Sasaki R, Naito Y, Kuzuhara S (1998) A novel de novo point mutation in the GTP cyclohydrolase I gene in a Japanese patient with hereditary progressive

- and dopa responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **65(6)**: 947
- [103] Saunders-Pullman RJ, Raymond D, Hyland K, et al. (1998) Markers of disease in dopa-responsive dystonia. *Mov Disord* **13 (Suppl 2)**: 285
 - [104] Sawle GV, Leenders KL, Brooks DJ, Harwood G, Lees AJ, Frackowiak RSJ, Marsden CD (1991) DOPA-responsive dystonia: [¹⁸F] DOPA Positron Emission Tomography. *Ann Neurol* **30**: 24-30
 - [105] Segawa M, Ohmi K, Itoh S, Aoyama M Hayakawa H (1971) Childhood basal ganglia disease with remarkable response to L-Dopa, hereditary basal ganglia disease with marked diurnal fluctuation. *Shinryo* (Tokyo) **24**: 667-672
 - [106] Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H (1976) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Adv Neurol* **14**: 215-233
 - [107] Shimoji M, Hirayama K, Hyland K, Kapatos G (1999) GTP cyclohydrolase I gene expression in the brains of male and female hph-1 mice. *J Neurochem* **72(2)**: 757-764 (Abstract)
 - [108] Smooker PM, Cotton RG (1995) Molecular basis of dihydropteridine reductase deficiency. *Hum Mutat* **5(4)**: 279-284
 - [109] Snow BJ, Nygaard TG, Takahashi H, Calne DB (1993) Positron emission tomographic studies of DOPA-responsive dystonia and early-onset idiopathic parkinsonism. *Ann Neurol* **34**: 733-738
 - [110] Steinberger D, Korinthenberg R, Topka H, Berghäuser M, Wedde R, Müller U (2000) Dopa-responsive dystonia: Mutation analysis of GCH1 and analysis of therapeutic doses of L-Dopa. German dystonia study group. *Neurology* **55(11)**: 1735-1737
 - [111] Steinberger D, Müller U (1996) Molekulargenetik und Klinik der Dopa-responsiven Dystonie. *Dt Arztebl* **93(24)**: A-1627-1629
 - [112] Steinberger D, Topka H, Fischer D, Müller U (1999) *GCH1* mutation in a patient with adult-onset oromandibular dystonia. *Neurology* **52**: 877-879
 - [113] Steinberger D, Weber Y, Korinthenberg R, Deuschl G, Benecke R, Martinijs J, Müller U (1998) High penetrance and pronounced variation in expressivity of GCH1 mutations in five families with dopa-responsive dystonia. *Ann Neurol* **43**: 634-639
 - [114] Strachan and Read: Human Molecular Genetics. BIOS Scientific Publishers Limited, (1996) 129-131
 - [115] Suzuki T, Ohye T, Inagaki H, Nagatsu T, Ichinose H (1999) Characterization of Wild-Type and Mutants of Recombinant Human GTP Cyclohydrolase I: Relationship to Etiology of Dopa-Responsive Dystonia. *J Neurochem* **73(6)**: 2510-2516
 - [116] Swaans RJM, Rondot P, Renier WO, van den Heuvel LPWJ, Steenbergen-Spanjers GCH, Wevers RA (2000) Four novel mutations in the Tyrosine Hydroxylase gene in patients with infantile parkinsonism. *Ann Hum Genet* **64**: 25-31
 - [117] Takahashi H, Levine RA, Galloway MPP, Snow BJ, Calne DB, Nygaard TG (1994) Biochemical and fluorodopa positron emission tomographic findings in an asymptomatic carrier of the gene for dopa-responsive dystonia. *Ann Neurol*

- [118] Tamaru Y, Hirano M, Ito H, Kawamura J, Matsumoto S, Imai T, Ueno S (1998) Clinical similarities of hereditary progressive/dopa responsive dystonia caused by different types of mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**: 469-473
- [119] Tassin J, Dürr A, Bonnet AM, Gil R, Vidailhet M, Lückung CB, Goas JY, Durif F, Abada M, Echenne B, Motte J, Lagueny A, Lacomblez L, Jedynak P, Bartholomé B, Agid Y, Brice A (2000) Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or parkin or parkin mutations? *Brain* **123**: 1112-1121
- [120] Thöny B, Blau N (1997) Mutations in the GTP Cyclohydrolase I and 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin Synthase Genes. *Hum Mutat* **10**: 11-20
- [121] Thöny B, Heizmann CW, Mattei MG (1994) Human GTP-Cyclohydrolase I Gene and Sepiapterin Reductase Gene Map to Region 14q21-q22 and 2p14-p12, Respectively, by *in Situ* Hybridization. *Genomics* **26**: 168-170
- [122] Thöny B, Leimbacher W, Blau N, Harvie A, Heizmann CW (1994) Hyperphenylalaninemia Due to Defects in Tetrahydrobiopterin Metabolism: Molecular Characterization of Mutations in 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin Synthase. *Am J Hum Genet* **54**: 782-792
- [123] Tsuji S et al.: Linkage analysis of hereditary progressive dystonia to the tyrosine hydroxylase gene locus. In: Segawa M (Hrsg.) Hereditary Progressive Dystonia with Marked Diurnal Fluctuation. Parthenon Publishing, New York (1993) 107-114
- [124] Turjanski N, Lees AJ, Brooks DJ (1997) Dopaminergic function in patients with posttraumatic parkinsonism: An ¹⁸F-dopa PET study. *Neurology* **49**: 183-189 (Abstract)
- [125] Urquhart A, Oldroyd NJ, Kimpton CP, Gill P (1995) Highly Discriminating Heptaplex Short Tandem Repeat PCR System for Forensic Identification. *Bio-Techniques* **18**: 116-121
- [126] van den Heuvel L, Smeitink B, de Rijk-van Andel J, Hyland K, Steenbergen-Spanjers GCH, Janssen RJT, Wevers RA (1998) A common point mutation in the tyrosine hydroxylase gene in autosomal recessive L-DOPA-responsive dystonia in the Dutch population. *Hum Genet* **102**: 664-646
- [127] Weber Y, Steinberger D, Deuschl G, Benecke R, Müller U (1997) Two previously unrecognized splicing mutations of GCH1 in Dopa-responsive dystonia: exon skipping and one base insertion. *Neurogenetics* **1**(2): 125-127
- [128] Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H (1993) Tetrahydrobiopterin and cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med* **203**: 1-12 (Abstract)
- [129] Wevers RA, de Rijk-van Andel JF, Bräutigam C, Geurtz B, van den Heuvel OP, Steenbergen-Spanjers GC, Smeitink JA, Hoffmann GF, Gabreels FJ (1999) A review of biochemical and molecular genetic aspects of tyrosine hydroxylase deficiency including a novel mutation (291delC). *J Inherit Metab Dis* **22**(4): 364-373
- [130] Williams AC, Eldridge R, Levine RA, Lovenberg W, Paulson G (1979) Low CSF hydroxylase cofactor (tetrahydrobiopterin) levels in inherited dystonia.

Lancet **2**: 410-411

- [131] Zhu M, Hirayama K, Kapatos G (1994) Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis in cultured dopamine neurons by depolarization and cAMP. *J Biol Chem* **269**: 11825-11829 (Abstract)
- [132] Ziegler L, Hültner L, Egger D, Kempkes B, Mailhammer R, Gillis S, Rodl W (1993) In a concerted action kit ligand and interleukin 3 control the synthesis of serotonin in murine bone marrow-derived mast cells. Up-regulation of GTP cyclohydrolase I and tryptophan 5-monooxygenase activity by the kit ligand. *J Biol Chem* **268**: 12544-12551 (Abstract)

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Fischer
Vorname:	Diana Gabriela
Geburtsdatum/-ort:	31.08.1974 in Siegen
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch

Schulbildung:

1980 - 1984	Grundschule in Katzenfurt
1984 – 1993	Johanneum-Gymnasium, Herborn
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1986	Helmholtz-Gymnasium, Heidelberg
1990 – 1991	Highschool-Aufenthalt in Indiana, USA

Hochschulbildung:

1993 – 1999	Justus-Liebig-Universität, Gießen: Humanmedizin
1995	Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
1996	Auslandsfamulatur Chirurgie in Geraldton, Australien
1996	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)
1998	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)
1999	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

Praktisches Jahr:

Chirurgie	Kreiskrankenhaus Gießen in Lich; Leitung: Prof. Dr. Hild
Pädiatrie (Wahlfach)	Tulane University, New Orleans, USA; Leitung: John E. Lewy, M.D.
	Universitätsklinikum, Gießen; Leitung: Prof. Dr. Gortner
Innere Medizin	Kreiskrankenhaus Gießen in Lich; Leitung: Prof. Dr. Goubeaud

Berufliche Tätigkeit:

Februar 2000 bis Juli 2001 (AiP)	Clementine-Kinderhospital in Frankfurt am Main; Leitung: Prof. Dr. Dippell
seit August 2001	Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Gießen; Leitung: Prof. Dr. Gortner

Promotionsarbeit:

1996-1998	Praktischer Teil im molekularbiologischen Labor des Instituts für Humangenetik: Mutationsanalysen bei Dopa-responsiver Dystonie
Veröffentlichungen	Fischer D, Steinberger D, Weber Y, Korinthenberg R, Deuschl G, Benecke R, Martinius J, Müller U (1998) Molecular genetic analyses of GCH1 in German patients with Dopa-responsive Dystonia. <i>Med Genet</i> 10 : 158 Steinberger D, Topka H, Fischer D, Müller U (1999) GCH1 mutation in a patient with adult-onset oromandibular dystonia. <i>Neurology</i> 52 : 877-879

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen bedanken, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Müller für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während des Verfassens dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Frau Dr. D. Steinberger für die Betreuung und kompetente Hilfe bei der Planung und Durchführung der Untersuchungen sowie bei der Auswertung der Ergebnisse.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an alle Mitarbeiter des Humangenetischen Instituts der Universität Gießen richten, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich in schwierigen Phasen des Experimentierens und Verfassens der Arbeit aufmunterten.

Zuletzt danke ich insbesondere denen, die durch ihre Liebe, Fürsorge und Unterstützung während des gesamten Studiums bis zuletzt diese Dissertation ermöglichten – meinen lieben Eltern.